

**Die Funktion des *coxF*-Genproduktes bei der
Reifung des aktiven Zentrums der Kohlenmonoxid-
Dehydrogenase in *Oligotropha carboxidovorans***

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften

der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Dipl. Biochemiker

Frank Mickoleit

aus Coburg

angefertigt am Lehrstuhl für Mikrobiologie

Universität Bayreuth

Mai 2014

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2009 bis März 2014 in Bayreuth am Lehrstuhl Mikrobiologie unter Betreuung von Herrn Professor Dr. Ortwin Meyer angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am:	27.05.2014
Zulassung durch die Promotionskommission:	04.06.2014
Wissenschaftliches Kolloquium:	04.11.2014

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Rhett Kempe

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Ortwin Meyer	(Erstgutachter)
Prof. Harold Drake, Ph.D.	(Zweitgutachter)
Prof. Dr. Gerrit Begemann	(Vorsitz)
Prof. Dr. Clemens Steegborn	

Für meine Eltern

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

Pelzmann, A., Mickoleit, F. & Meyer, O. (2014) Insights into the posttranslational assembly of the Mo-, S- and Cu-containing cluster in the active site of CO dehydrogenase of *Oligotropha carboxidovorans*. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 19, 1399-1414.

Inhaltsverzeichnis

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die biologische Bedeutung von atmosphärischem Kohlenmonoxid	1
1.2	Das carboxidotrophe Bakterium <i>Oligotropha carboxidovorans</i>	1
1.3	Das DNA-Megaplasmid pHCG3 aus <i>O. carboxidovorans</i>	4
1.4	Die drei Klassen mononuklearer Molybdoenzyme	7
1.5	CO-Dehydrogenasen als Schlüsselenzyme im CO-Stoffwechsel	10
1.5.1	NiFe-Kohlenmonoxid-Dehydrogenasen	10
1.5.2	Die CO-Dehydrogenase aus <i>O. carboxidovorans</i>	20
1.6	Das aktive Zentrum der CO-Dehydrogenase aus <i>O. carboxidovorans</i>	22
1.7	Chemische Rekonstitution des aktiven Zentrums der CO-Dehydrogenase aus <i>O. carboxidovorans</i>	29
1.8	Der Subcluster <i>coxDEFG</i> und dessen Genprodukte	32
1.9	Zielsetzung der Arbeit	34
2	Materialien und Methoden	36
2.1	Chemikalien und Gase	36
2.2	Organismen	36
2.3	Plasmide	37
2.4	Konstruktion einer <i>coxF</i> -Insertionsmutante von <i>O. carboxidovorans</i> OM5	37
2.5	Konstruktion einer <i>coxG</i> -Insertionsmutante von <i>O. carboxidovorans</i> OM5	41
2.6	Heterologe Genexpression von CoxF in <i>E. coli</i> AD494(DE3)/pSL1	43
2.6.1	Subklonierung von <i>coxF</i> in den Vektor pET16b	44
2.6.2	Subklonierung von <i>coxF</i> in den Vektor pET11a und Transformation in <i>E. coli</i> AD494(DE3)	45
2.7	Anzucht von Bakterien	46
2.7.1	Anzucht von <i>O. carboxidovorans</i> OM5 (Wildtyp und Mutanten)	46
2.7.2	Anzucht von <i>E. coli</i>	49
2.8	Ernte und Lagerung der Zellen	50

2.9	Stammhaltung.....	50
2.10	Das pET-Expressionssystem zur heterologen Genexpression in <i>E. coli</i>	51
2.11	Zellaufschluss und Herstellung von Extrakten.....	52
2.12	Aufbereitung / Waschen der Membranfraktionen.....	53
2.13	Zellaufschluss durch Permeabilisierung der Zellwand mit Triton X-100.....	54
2.14	Gewinnung von rekombinantem CoxF aus <i>E. coli</i> AD494(DE3)/pSL1	54
2.14.1	Produktion von rückgefaltetem CoxF aus Einschlusskörpern	54
2.14.2	Anreicherung von löslichem CoxF über Gelfiltration.....	56
2.15	Aufreinigung von CO-Dehydrogenase mittels Säulenchromatographie.....	57
2.15.1	Anionenaustauschchromatographie an Macro-Prep High Q	57
2.15.2	Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) an Butyl Sephacrose 4 Fast Flow.....	58
2.15.3	Gelfiltration zum Entsalzen und Umpuffern von Proteinlösungen	59
2.15.4	Aufkonzentrieren von Proteinlösungen.....	59
2.16	Methoden zur Proteinbestimmung	59
2.16.1	Bestimmung des Proteingehalts über den Flavinegehalt (A_{450}).....	59
2.16.2	Proteinbestimmung nach Beisenherz et al. (1953).....	60
2.16.3	Proteinbestimmung nach Bradford (1976).....	61
2.17	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	61
2.18	Western-Blotting	64
2.19	Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz von CoxF.....	65
2.20	Produktion polyklonaler Immunglobulin G - Antikörper gegen CoxF.....	66
2.21	Anreicherung von IgG - Antikörpern an Protein A.....	67
2.22	Immunologischer Nachweis von Proteinen.....	69
2.23	Videodensitometrische Auswertung von denaturierenden und nativen Polyacrylamid-Gelen und immunologisch gefärbten Western-Blots.....	71
2.24	Assays zur Bestimmung von Enzym-Aktivitäten	71
2.24.1	CO-oxidierende Aktivität von CO-Dehydrogenase	71
2.24.2	Malat- und NADH-Dehydrogenase-Aktivität	73
2.24.3	Aktivität saurer Phosphatasen	73
2.25	Ultrazentrifugation im Saccharosedichtegradienten	75
2.25.1	Fraktionierung im diskontinuierlichen Dichtegradienten	75

2.25.2 Ultrazentrifugation im linearen Saccharosedichtegradienten zur Bestimmung von Molekulargewichten	76
2.26 Spektroskopische Methoden	77
2.26.1 Aufnahme von UV/VIS-Absorptionsspektren und Bestimmung der katalytischen Funktionalität	77
2.26.2 Elektronspinresonanz-Spektroskopie (ESR)	78
2.26.3 Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie	79
2.27 Elementanalysen im quantitativen Maßstab	80
2.27.1 Chemische Analysen	80
2.27.2 Bestimmung von Metallen mittels Atomabsorptions- spektroskopie (AAS)	85
2.27.3 Bestimmung von Metallgehalten über Neutronenaktivierungs- analyse (NAA)	85
2.27.4 Bestimmung von Metallen durch Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS)	86
2.28 Bestimmung des FAD-Gehalts	87
2.29 Chemische Rekonstitution des aktiven Zentrums von CO-Dehydrogenase	87
2.29.1 Inaktivierung mit Kaliumcyanid	87
2.29.2 Rekonstitution des cyanolysierbaren Schwefels	88
2.29.3 Rekonstitution des Kupfer (I)	88
2.30 Kristallisation der CO-Dehydrogenase aus <i>O. carboxidovorans</i> OM5 F::km	89
2.31 Alkylierung / „Verkappung“ von Cystein-Resten	89
2.32 Alkylierung von CO-Dehydrogenase mit ^{14}C -Iodacetamid	90
2.32.1 Ermittlung des Anteils an gebundenem ^{14}C -Iodacetamid in Lösungen von CO-Dehydrogenase	90
2.32.2 Ermittlung des Anteils an gebundenem ^{14}C -Iodacetamid über denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	92
2.33 Inkubation von CO-Dehydrogenase-Präparaten mit Schwefelverbindungen zum Erhalt von Strukturinformationen	93
2.34 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	94
2.35 Bioinformatische Analyse von Proteinsequenzen und Vorhersage von Sekundärstruktur-Elementen	94

3 Ergebnisse	96
3.1 Bioinformatische Charakterisierung des CoxF-Polypeptides	96
3.2 Bioinformatische Charakterisierung des CoxG-Polypeptides.....	101
3.3 Heterologe Expression von CoxF in <i>E. coli</i> AD494(DE3)/pSL1	103
3.4 Heterologes CoxF-Protein wird in <i>E. coli</i> AD494(DE3) sowohl löslich als auch in Form von Einschlusskörpern gebildet.....	106
3.5 Spezifische Immunglobulin G-Antikörper zur Detektion von homologem und rekombinantem CoxF.....	108
3.6 CoxF bildet keine inter- oder intramolekularen Disulfidbrücken aus.....	111
3.7 Translation der Cox-Proteine in <i>O. carboxidovorans</i> OM5.....	114
3.8 Subzelluläre Lokalisation der Cox-Proteine in <i>O. carboxidovorans</i> OM5: CoxF wird als lösliches Protein gebildet, während CoxD und CoxE membrangebunden erscheinen	116
3.9 Zentrifugation in Saccharosedichtegradienten zur Analyse von Translation, subzellulärer Lokalisierung und Oligomerisierung der Cox-Proteine	117
3.10 Das Wachstum von <i>O. carboxidovorans</i> OM5 (Wildtyp und Mutanten) unter chemolithoautotrophen Bedingungen	138
3.11 Anreicherung und Isolierung der CO-Dehydrogenase aus <i>O. carboxidovorans</i> OM5 F::km.....	142
3.12 Die Mutation im <i>coxF</i> -Gen von <i>O. carboxidovorans</i> OM5 hat keinen Einfluss auf die Assemblierung und Mobilität der gebildeten CO-Dehydrogenase	148
3.13 Im Gegensatz zu <i>O. carboxidovorans</i> OM5 G::km wird in der <i>coxF</i> - Mutante eine inaktive CO-Dehydrogenase gebildet, die cyanolysier- baren Schwefel besitzt, aber Kupfer-defizient ist	148
3.14 Im Gegensatz zur <i>coxG</i> -Mutante wird in der <i>coxF</i> -Mutante eine nicht funktionelle CO-Dehydrogenase gebildet.....	159
3.15 Die CO-Dehydrogenase aus <i>O. carboxidovorans</i> OM5 F::km lässt sich zu einem aktiven Enzym rekonstituieren	163
3.16 Die Rekonstituierbarkeit der CO-Dehydrogenase aus der <i>coxF</i> -Mutante von <i>O. carboxidovorans</i> OM5 ist abhängig vom verwendeten Puffersystem und dessen pH-Wert	174
3.17 [2Fe-2S]-Zentren der CO-Dehydrogenase aus der <i>coxF</i> -Mutante von <i>O. carboxidovorans</i> OM5 und der Gehalt an säurelabilem Schwefel.....	177

3.18 ESR-spektroskopische Analysen am Mo-Zentrum der CO-Dehydrogenase der Mutantenstämme F::km und G::km	179
3.19 Kristallisation der CO-Dehydrogenase aus der <i>coxF</i> -Mutante von <i>O. carboxidovorans</i> OM5: Verlust des cyanolysierbaren Schwefels.....	183
3.20 Alkylierungsexperimente zur Strukturaufklärung: Einfluss von Alkylierungsmitteln auf die Aktivität und Rekonstituierbarkeit der CO-Dehydrogenase	187
3.21 Schwefelverbindungen als Reporter für Cu-defiziente active site-Cluster	204
3.22 Anreicherung von rekombinantem CoxF aus Einschlusskörpern von <i>E. coli</i> AD494(DE3)/pSL1	220
3.23 Rückfaltung von rekombinantem CoxF aus solubilisierten Einschlusskörpern aus <i>E. coli</i> AD494(DE3)/pSL1	223
3.24 Das rekombinante, rückgefaltete CoxF aus Einschlusskörpern zeigt Sekundärstruktur-Elemente, ist aber dennoch instabil	224
3.25 Das rekombinante, rückgefaltete CoxF aus Einschlusskörpern bildet Oligomere.....	228
3.26 Rekombinantes, löslich gebildetes CoxF aus <i>E. coli</i> AD494(DE3)/pSL1 liegt in verschiedenen oligomeren Zuständen vor und lässt sich partiell anreichern	233
3.27 CoxF zeigt Hinweise auf eine vorhandene Phosphatase-Aktivität	237
4 Diskussion	243
4.1 Die Sequenzen der Genprodukte <i>coxDEF</i> und prognostizierte Funktionen der resultierenden Polypeptide	243
4.2 Die Polypeptide CoxD, CoxE und CoxF zeigen Motive der Familie der DEAD-Box RNA-Helikasen	247
4.3 Die Funktionen von CoxF und CoxG für das CO-chemolithoautotrophe Wachstum von <i>O. carboxidovorans</i> OM5	250
4.4 In der <i>coxF</i> -Mutante von <i>O. carboxidovorans</i> OM5 wird eine inaktive CO-Dehydrogenase gebildet, die komplett in ihrer Untereinheitenstruktur und Kofaktor-Assemblierung ist	251
4.5 Chemische Rekonstitution des aktiven Zentrums von CO-Dehydrogenase und ESR als Reporter für paramagnetische Mo-Zentren	255

4.6	Die Assemblierung des aktiven Zentrums von CO-Dehydrogenase <i>in vivo</i> erfolgt über verschiedene Typen von Mo-Zentren.....	257
4.7	Modell der Reifung des [CuSMoO ₂]-Clusters und Funktionen der Polypeptide CoxD, CoxE und CoxF	262
4.8	CoxG fungiert als Membran-Anker für CO-Dehydrogenase	265
4.9	Rekombinantes CoxF lässt sich in Form von Einschlusskörpern effektiv anreichern, ist nach der Rückfaltung aber instabil	266
4.10	Oligomerisierung der Cox-Proteine	270
5	Zusammenfassung.....	276
6	Summary	279
7	Literaturverzeichnis.....	282

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1:	Bakterienstämme	36
Tabelle 2-2:	Plasmide aus <i>O. carboxidovorans</i> und <i>E. coli</i>	37
Tabelle 2-3:	<i>E. coli</i> -Stämme zur Konstruktion der <i>coxF</i> -Insertionsmutante.....	40
Tabelle 2-4:	Plasmide aus <i>E. coli</i> und <i>O. carboxidovorans</i> OM5 zur Konstruktion der <i>coxF</i> -Insertionsmutante	40
Tabelle 2-5:	Plasmide aus <i>E. coli</i> und <i>O. carboxidovorans</i> OM5 zur Konstruktion der <i>coxG</i> -Insertionsmutante.....	43
Tabelle 2-6:	verwendete Primer zur Subklonierung von <i>coxF</i> in den Expressionsvektor pET16b.....	44
Tabelle 2-7:	verwendete <i>E. coli</i> - Stämme zur Erzeugung des heterologen Expressionssystems von CoxF	46
Tabelle 2-8:	Plasmide aus <i>E. coli</i> und <i>O. carboxidovorans</i> zur Konstruktion des Expressionsstammes <i>E. coli</i> AD494(DE3)/pSL1.....	46
Tabelle 2-9:	Wachstumsbedingungen für <i>O. carboxidovorans</i> - Flüssigkulturen und Zusammensetzung der zugehörigen Gasatmosphäre	48
Tabelle 2-10:	Pipettierschema für Polyacrylamidgele.....	62
Tabelle 2-11:	Pipettierschema zur Aktivitätsbestimmung saurer Phosphatasen, modifiziert nach Hillmann (1971).....	75
Tabelle 3-1:	Vergleich des CoxF-Proteins aus <i>O. carboxidovorans</i> OM5 mit anderen Polypeptiden teilweise noch unbekannter Funktion.....	96
Tabelle 3-2:	Vorhergesagte Strukturelemente und deren prozentualer Anteil in der Sequenz von CoxF aus <i>O. carboxidovorans</i> OM5.....	98
Tabelle 3-3:	Vergleich des CoxG-Proteins aus <i>O. carboxidovorans</i> OM5 mit anderen Polypeptiden teilweise noch unbekannter Funktion.....	101

Tabelle 3-4:	Vorhergesagte Strukturelemente und deren prozentualer Anteil in der Sequenz von CoxG aus <i>O. carboxidovorans</i> OM5	102
Tabelle 3-5:	Translation der Polypeptide CoxD, CoxE und CoxF in <i>O. carboxidovorans</i> OM5 (Wildtyp und Mutanten)	115
Tabelle 3-6:	Detektion von CoxD, CoxE und CoxF in Saccharosedichtegradienten von <i>O. carboxidovorans</i> OM5	124
Tabelle 3-7:	Detektion von CoxD, CoxE und CoxF in Saccharosedichtegradienten von Triton-Extrakten aus <i>O. carboxidovorans</i> OM5	132
Tabelle 3-8:	Anreicherung der CO-Dehydrogenase aus <i>O. carboxidovorans</i> OM5 F::km	146
Tabelle 3-9:	Schwefel-, Selen- und Metallgehalte der CO-Dehydrogenase aus der <i>coxF</i> -Mutante von <i>O. carboxidovorans</i> OM5	158
Tabelle 3-10:	Schwefel- und Metallgehalte der CO-Dehydrogenase aus der <i>coxG</i> - Mutante von <i>O. carboxidovorans</i> OM5	159
Tabelle 3-11:	Charakteristische Absorptionsquotienten zur Reinheitskontrolle und zur Ermittlung des Gehalts an Eisen-Schwefel-Zentren und FAD in wildtypischer CO-Dehydrogenase sowie Präparaten der <i>coxF</i> - und <i>coxG</i> -Mutante	163
Tabelle 3-12:	Gehalt an cyanolysierbarem Schwefel und Kupfer der CO-Dehydrogenase aus dem Mutantenstamm <i>O. carboxidovorans</i> OM5 F::km nach Rekonstitution	169
Tabelle 3-13:	Aktivitäten der CO-Dehydrogenase aus der <i>coxF</i> -Mutante von <i>O. carboxidovorans</i> OM5 nach Rekonstitution in verschiedenen Puffersystemen	176
Tabelle 3-14:	Detektierte Mole an ¹⁴ C-IAA in Proteinpellets und Überständen verschiedener Präparate von CO-Dehydrogenase nach TCA-Fällung	202
Tabelle 3-15:	CO-oxidierende Aktivität verschiedener CO-Dehydrogenase (CODH) - Spezies nach Inkubation mit Schwefelverbindungen und nachfolgender Cu-Rekonstitution	216

Tabelle 3-16: Prozentuale Anteile der drei Typen an Metallzentren in der CO-Dehydrogenase aus der <i>coxF</i> -Mutante von <i>O. carboxidovorans</i> OM5	219
Tabelle 3-17: Anreicherung von rekombinantem CoxF aus Einschlusskörpern von <i>E. coli</i> AD494(DE3)/pSL1	222
Tabelle 3-18: Sekundärstrukturelemente des rückgefalteten rekombinanten CoxF-Proteins.....	227
Tabelle 3-19: Oligomere von CoxF in Saccharosedichtegradienten-Zentrifugationen	231
Tabelle 3-20: Elutionsvolumina und berechnete molekulare Massen des rekombinanten CoxF-Proteins bzw. dessen Oligomere nach Gelfiltration an einer HiPrep Sephacryl S-400 Säule.....	235
Tabelle 3-21: Phosphatasen und Phosphatase-ähnliche Proteine aus <i>O. carboxidovorans</i> OM5	240

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: CO-insensitive und CO-sensitive Elektronentransportkette in <i>O. carboxidovorans</i> (nach Cypionka und Meyer 1983).....	3
Abbildung 1-2: Das <i>low copy</i> Megaplasmid pHCG3 aus <i>O. carboxidovorans</i> OM5 (Fuhrmann et al. 2003)	4
Abbildung 1-3: Struktur des <i>cox</i> -Genclusters auf dem 133-kb Megaplasmid pHCG3 von <i>Oligotropha carboxidovorans</i> OM5 mit den vorhergesagten Funktionen (Fuhrmann et al. 2003).....	5
Abbildung 1-4: Struktur des Pterin-Kofaktors (A) sowie der drei Familien der mononuklearen Molybdoenzyme (B) (verändert nach Hille 1996)	8
Abbildung 1-5: Kristallstruktur der homodimeren CODH II aus <i>C. hydrogeniformans</i> und Anordnung der Cluster für den Elektronen-Transfer (aus Dobbek et al. 2001)	12

Abbildung 1-6:	Struktur des [Ni-4Fe-5S] - Clusters von CODH II aus <i>C. hydrogenoformans</i> und Struktur-basiertes Modell der CO-Bindung und Initiation der CO-Oxidation (aus Dobbek et al. 2001).....	14
Abbildung 1-7:	Modell der dreidimensionalen Struktur des C-Clusters der CO-Dehydrogenase aus <i>Rhodospirillum rubrum</i> (aus Jeon et al. 2005).....	15
Abbildung 1-8:	Modelle der Ni-Insertion in den C-Cluster der NiFe CO-Dehydrogenase (aus Jeon et al. 2005).....	16
Abbildung 1-9:	Struktur des ACS/CODH-Komplexes aus <i>M. thermoacetica</i> (nach Doukov et al. 2002).....	18
Abbildung 1-10:	Vorgeschlagener Mechanismus der Acetyl-CoA-Synthase Reaktion (aus Doukov et al. 2002).....	19
Abbildung 1-11:	Kristallstruktur des CO-Dehydrogenase-Dimers aus <i>Oligotropha carboxidovorans</i> OM5 (Dobbek et al. 1999; Meyer et al. 2000).....	21
Abbildung 1-12:	Intramolekularer Elektronentransport der CO-Dehydrogenase (Dobbek et al. 1999).....	22
Abbildung 1-13:	Das aktive Zentrum oxidierter CO-Dehydrogenase aus <i>O. carboxidovorans</i> OM5 als Röntgenstruktur mit einer Auflösung von 1,1 Å (Dobbek et al. 2002).....	23
Abbildung 1-14:	Das aktive Zentrum der CO-Dehydrogenase aus <i>O. carboxidovorans</i> OM5 als Röntgenstruktur nach Inhibierung mit nBIC (Dobbek et al. 2002).....	24
Abbildung 1-15:	Hypothetischer Reaktionsmechanismus der Oxidation von CO im aktiven Zentrum von CO-Dehydrogenase nach Dobbek et al. (2002)....	25
Abbildung 1-16:	Modifizierter Reaktionszyklus für die Oxidation von CO und MeNC (verändert nach Hofmann et al. 2005).....	27
Abbildung 1-17:	Modifizierter katalytischer Zyklus der CO-Oxidation unter Berücksichtigung der Bildung von S-C - Bindungen (verändert nach Siegbahn und Shestakov 2005).....	28

Abbildung 1-18:	Mechanismus der chemischen Rekonstitution des aktiven Zentrums von CO-Dehydrogenase (aus Resch et al. 2005)	30
Abbildung 2-1:	pET-Expressionssystem für die Überexpression von CoxF in <i>E. coli</i> AD494(DE3)/pSL1 (verändert aus Primrose und Twyman 2006)	52
Abbildung 2-2:	Aufbau des „Blotsandwich“ für den Transfer der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran	64
Abbildung 3-1:	Vorhergesagte Sekundärstruktur des CoxF-Proteins aus <i>O. carboxidovorans</i> OM5, sowie Motive und Schlüsselemente	97
Abbildung 3-2:	Konservierte Motive der Familie der DEAD-Box RNA-Helikasen (aus Rocak und Linder 2004)	100
Abbildung 3-3:	Vorhergesagte Sekundärstruktur-Elemente und Motive des CoxG-Polypeptides aus <i>O. carboxidovorans</i> OM5.....	102
Abbildung 3-4:	Heterologe Expression von CoxF aus <i>O. carboxidovorans</i> OM5 in <i>E. coli</i> AD494(DE3)/pSL1	105
Abbildung 3-5:	Analyse subzellulärer Fraktionen von IPTG-induziertem <i>E. coli</i> AD494(DE3)/pSL1 auf das Vorhandensein von rekombinantem CoxF.....	107
Abbildung 3-6:	Produktion polyklonaler Immunglobulin G - Antikörper gegen CoxF.....	110
Abbildung 3-7:	Mobilität des CoxF-Proteins bzw. dessen Bande in SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen	113
Abbildung 3-8:	Translationsanalyse der Proteine CoxD, CoxE und CoxF in zellfreien Rohextrakten von <i>O. carboxidovorans</i> OM5 Wildtyp und der Insertionsmutanten D::km, E::km und F::km.....	115
Abbildung 3-9:	Subzelluläre Lokalisierung der Proteine CoxD, CoxE und CoxF in <i>O. carboxidovorans</i> OM5	116

Abbildung 3-10:	Subzelluläre Lokalisierung der Proteine CoxD, CoxE und CoxF in zellfreiem Rohextrakt von <i>O. carboxidovorans</i> OM5 (CO-chemolithoautotroph angezüchtet) mittels Saccharose- dichtegradienten-Zentrifugation	118
Abbildung 3-11:	Subzelluläre Lokalisierung der Proteine CoxD, CoxE und CoxF in der Membranfraktion von <i>O. carboxidovorans</i> OM5 (CO-chemolithoautotroph angezüchtet) mittels Saccharose- dichtegradienten-Zentrifugation	121
Abbildung 3-12:	Subzelluläre Lokalisierung der Proteine CoxD, CoxE und CoxF in der cytoplasmatischen Fraktion von <i>O. carboxidovorans</i> OM5 (CO-chemolithoautotroph angezüchtet) mittels Saccharose- dichtegradienten-Zentrifugation	123
Abbildung 3-13:	Saccharosedichtegradient zur subzellulären Lokalisierung der Proteine CoxD, CoxE und CoxF im löslichen Extrakt von <i>O. carboxidovorans</i> OM5 (CO-chemolithoautotroph angezüchtet) nach Triton-Aufschluss	126
Abbildung 3-14:	Saccharosedichtegradient zur subzellulären Lokalisierung der Proteine CoxD, CoxE und CoxF im Rohextrakt nach Triton- Behandlung	129
Abbildung 3-15:	Subzelluläre Lokalisierung der Proteine CoxD, CoxE und CoxF in zellfreiem Rohextrakt von <i>O. carboxidovorans</i> OM5 (angezüchtet unter CO-induzierenden Bedingungen) mittels Saccharosedichte- gradienten-Zentrifugation	133
Abbildung 3-16:	Translation und Lokalisierung der Proteine CoxD, CoxE und CoxF in zellfreiem Rohextrakt von <i>O. carboxidovorans</i> OM5 E::km und F::km mittels Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation	136
Abbildung 3-17:	Wachstumskurven des Wildtyps von <i>O. carboxivorans</i> OM5 sowie der Mutanten F::km und G::km	141
Abbildung 3-18:	Anreicherung der CO-Dehydrogenase aus <i>O. carboxidovorans</i> OM5 F::km mittels Anionenaustauschchromatographie	143

Abbildung 3-19:	Anreicherung der CO-Dehydrogenase aus <i>O. carboxidovorans</i> OM5 F::km mittels hydrophober Interaktionschromatographie	145
Abbildung 3-20:	Verlauf der Aufreinigung / Anreicherung der CO-Dehydrogenase aus <i>O. carboxidovorans</i> OM5 F::km.....	147
Abbildung 3-21:	CO-oxidierende Aktivität der CO-Dehydrogenase aus der <i>coxF</i> -Mutante von <i>O. carboxidovorans</i> OM5	150
Abbildung 3-22:	Gehalt an cyanolysierbarem Schwefel in den CO-Dehydrogenasen aus dem Wildtyp von <i>O. carboxidovorans</i> OM5 sowie der <i>coxF</i> -Mutante.....	151
Abbildung 3-23:	Hypothetische Strukturen des aktiven Zentrums der CO-Dehydrogenase der <i>coxF</i> -Mutante aus <i>O. carboxidovorans</i> OM5 unter Annahme eines „kontaminierenden“ Zink-Ions.....	155
Abbildung 3-24:	UV/VIS-Absorptionsspektren der CO-Dehydrogenase aus der <i>coxF</i> - und der <i>coxG</i> -Mutante, sowie dem Wildtyp von <i>O. carboxidovorans</i> OM5	161
Abbildung 3-25:	Funktionelle Rekonstitution des [CuSMoO ₂]-Clusters im aktiven Zentrum verschiedener Spezies von CO-Dehydrogenase	164
Abbildung 3-26:	Nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese der CO-Dehydrogenase aus der <i>coxF</i> -Mutante nach chemischer Rekonstitution	167
Abbildung 3-27:	UV/VIS-Absorptionsspektren von verschiedenen Rekonstitutionsansätzen der CO-Dehydrogenase aus der <i>coxF</i> -Mutante von <i>O. carboxidovorans</i> OM5	173
Abbildung 3-28:	Funktionelle Rekonstitution des [CuSMoO ₂]-Clusters der CO-Dehydrogenase aus der <i>coxF</i> -Mutante in verschiedenen Puffersystemen	175
Abbildung 3-29:	Analyse der [2Fe-2S]-Zentren der CO-Dehydrogenase aus der <i>coxF</i> -Mutante von <i>O. carboxidovorans</i> OM5 über Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR)	179

Abbildung 3-30:	Untersuchung des Mo-Zentrums der CO-Dehydrogenasen aus dem Wildtyp und den Insertionsmutanten in <i>coxF</i> und <i>coxG</i> (jeweils CO-induziert gewachsen) mittels ESR.....	182
Abbildung 3-31:	Hypothetische Strukturen des aktiven Zentrums der CO-Dehydrogenase aus der <i>coxF</i> -Mutante	184
Abbildung 3-32:	Proteinkristalle der CO-Dehydrogenase aus der <i>coxF</i> -Mutante von <i>O. carboxidovorans</i> OM5	185
Abbildung 3-33:	Möglicher Mechanismus der chemischen Rekonstitution von CO-Dehydrogenase aus <i>O. carboxidovorans</i> OM5 unter der Annahme der Bildung eines Persulfids am Cystein ³⁸⁸	189
Abbildung 3-34:	Ermittlung der Anzahl notwendiger Waschschrte mittels Ammoniumsulfatfällung nach Inkubation von CO-Dehydrogenase mit ¹⁴ C-IAA.....	191
Abbildung 3-35:	Konzentrationsabhängige Alkylierung von CO-Dehydrogenase aus <i>O. carboxidovorans</i> OM5 (Wildtyp und <i>coxG</i> -Mutante) mit ¹⁴ C-Iodacetamid	194
Abbildung 3-36:	Konzentrationsabhängige Alkylierung von KCN-inaktivierter und sulfurierter CO-Dehydrogenase aus <i>O. carboxidovorans</i> OM5 mit ¹⁴ C-Iodacetamid	196
Abbildung 3-37:	Konzentrationsabhängige Alkylierung von CO-Dehydrogenase Präparaten der <i>coxD</i> -Mutante von <i>O. carboxidovorans</i> OM5 mit ¹⁴ C-Iodacetamid	198
Abbildung 3-38:	Konzentrationsabhängige Markierung verschiedener Präparate von CO-Dehydrogenase aus Mutanten von <i>O. carboxidovorans</i> OM5 mit ¹⁴ C-Iodacetamid	200
Abbildung 3-39:	ESR-spektroskopische Analyse der CO-Dehydrogenase verschiedener Wildtyp-Präparate von <i>O. carboxidovorans</i> OM5 nach Inkubation mit Schwefelverbindungen.....	206

Abbildung 3-40:	ESR-spektroskopische Analyse verschiedener [MoO ₃]-Spezies von CO-Dehydrogenase aus <i>O. carboxidovorans</i> OM5 nach Inkubation mit Schwefelverbindungen	211
Abbildung 3-41:	ESR-spektroskopische Analyse von [MoO ₂ S] - CO-Dehydrogenase aus <i>O. carboxidovorans</i> OM5 nach Inkubation mit Schwefelverbindungen	214
Abbildung 3-42:	ESR-spektroskopische Analyse der CO-Dehydrogenase aus der <i>coxF</i> -Mutante von <i>O. carboxidovorans</i> OM5 nach Inkubation mit Schwefelverbindungen	218
Abbildung 3-43:	SDS-PAGE zum Verlauf der Anreicherung von rekombinantem CoxF aus Einschlusskörpern	221
Abbildung 3-44:	Absorptionsspektrum und CD-Spektrum von rückgefaltetem, rekombinantem CoxF aus solubilisierten Einschlusskörpern	226
Abbildung 3-45:	Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation von rekombinantem, rückgefaltetem CoxF	229
Abbildung 3-46:	Transmissionselektronenmikroskopische (TEM-) Aufnahmen von rekombinantem, rückgefaltetem CoxF	232
Abbildung 3-47:	Anreicherung von heterolog exprimiertem, löslichem CoxF (aus der cytoplasmatischen Fraktion von <i>E. coli</i> AD494(DE3)/pSL1) mittels Gelfiltration an einer S-400 Sephacryl Säule	236
Abbildung 3-48:	Aktivität saurer Phosphatasen in Saccharosedichtegradienten der cytoplasmatischen Fraktion aus dem Wildtyp und der <i>coxF</i> -Mutante von <i>O. carboxidovorans</i> OM5	238
Abbildung 3-49:	Trennung von CoxF - Oligomeren (in der cytoplasmatischen Fraktion von <i>E. coli</i> AD494(DE3)/pSL1) mittels Gelfiltration und koinzidierende Phosphatase-Aktivität	242
Abbildung 4-1:	Vorhergesagte Sekundärstruktur-Elemente und Motive der Polypeptide CoxD und CoxE aus <i>O. carboxidovorans</i> OM5 (aus Pelzmann et al. 2014)	245

Abbildung 4-2:	Konservierte Motive der DEAD-Box- und verwandten DEXD/H-Box-Familien von RNA-Helikasen (aus Cordin et al. 2006)	248
Abbildung 4-3:	Konservierte Motive der Familie der DEAD-Box RNA-Helikasen und entsprechende homologe Motive auf den Polypeptiden CoxD, CoxE und CoxF	249
Abbildung 4-4:	Assemblierung von Xanthin-Dehydrogenase (XDH) in <i>R.</i> <i>capsulatus</i> und die Rolle von XdhC bei der Reifung des Molybdän- Kofaktors (verändert aus Neumann und Leimkühler 2011).....	258
Abbildung 4-5:	Biosynthese des Eisen-Molybdän-Kofaktors (FeMoCo) von Nitrogenase (aus Schwarz et al. 2009)	259
Abbildung 4-6:	Modell der Reifung des bimetallischen Clusters im aktiven Zentrum von CO-Dehydrogenase aus <i>O. carboxidovorans</i> OM5 (aus Pelzmann et al. 2014)	264
Abbildung 4-7:	Modell zur Rekrutierung löslicher CO-Dehydrogenase zur Cytoplasma-Membran mittels CoxG	266
Abbildung 4-8:	Assemblierung und katalysierte Reaktion von Mg-Chelatase in <i>R. capsulatus</i> (A, B; aus Bollivar 2010) sowie Struktur des BchID- Komplexes in Gegenwart von ADP bei einer Auflösung von 7,5 Å (C; aus Lundqvist et al. 2010)	271

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
A ₄₅₀	Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm
Å	Angström
AAS	Atomabsorptions-Spektroskopie
Abb.	Abbildung
Ap	Ampicillin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
CD	Circulardichroismus
Cm	Chloramphenicol
CO	Kohlenmonoxid
CO ₂	Kohlendioxid
d	Schichtdicke (cm)
Da	Dalton
DFT	diskrete Fourier-Transformation
DIG	Digoxigenin
DNase	Desoxyribonuklease
E	Extinktion
ε	millimolarer Extinktionskoeffizient (mM ⁻¹ cm ⁻¹)
ESR	Elektronspinresonanz
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
Formazan	1-(4-Iodophenyl)-3-phenyl-5-(4-Nitrophenyl)-formazan
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
H ₂	Wasserstoff
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HIC	hydrophobe Interaktionschromatographie
ICP-MS	Induced-Coupled-Plasma-Massenspektrometrie
IgG	Immunoglobulin G
INT	2-(4-Iodophenyl)-3-(4-Nitrophenyl)-2 <i>H</i> -Tetrazoliumchlorid
IPTG	Isopropyl-β-thiogalaktosid

Abkürzungsverzeichnis

Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare
Km	Kanamycin
L	Liter
LB	Luria Bertani
M	Molar
mA	Milliampere
Mbp	Megabasenpaare
MCD	Molybdopterin-Cytosin-Dinukleotid
min	Minute
ml	Milliliter
MPMS	1-Methoxyphenazinmethosulfat
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
v	Mikrowellenfrequenz (GHz)
n.b.	nicht bestimmt
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
OD ₄₃₆	optische Dichte bei 436 nm
<i>orf</i>	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pI	isoelektrischer Punkt
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
ppb	parts per billion (Teile pro Milliarde)
ppm	parts per million (Teile pro Million)
rpm	Umdrehungen pro Minute
Θ_{MRW}	mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure ($\text{Grad} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$)
Θ	gemessene Elliptizität
'S'	cyanolysierbarer Schwefel (Sulfanschwefel)
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

Abkürzungsverzeichnis

TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Unit
UV/VIS	Ultraviolett/sichtbares Licht
V	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
zREX	zellfreier Rohextrakt

Buchstaben-Code der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

1 Einleitung

1.1 Die biologische Bedeutung von atmosphärischem Kohlenmonoxid

Kohlenmonoxid (CO) kommt in der Atmosphäre als Spurengas mit einem Volumenanteil von 50 - 200 ppb vor (Robinson und Robbins 1970; Rinsland et al. 2007). Es handelt sich dabei um ein farb- und geruchloses Gas mit hoher Toxizität, welches ab einem Gehalt von 1.000 ppm für den Menschen tödlich ist. Hierfür verantwortlich ist die Fähigkeit des CO an Metalloproteine zu binden, die an lebenswichtigen Prozessen beteiligt sind, insbesondere an solche wie Hämoglobin und Cytochrom-Oxidase (Meyer et al. 2000). Die Affinität von CO zu Hämoglobin ist beispielsweise mehr als 230-fach höher als die von Sauerstoff (Townsend und Maynard 2002), wodurch geringe CO-Konzentrationen ausreichen können, um die Bindestellen für Sauerstoff zu blockieren und damit dessen Transport im Blut zu inhibieren. Für das Überleben von Organismen mit respiratorischem Stoffwechsel ist daher nicht nur der Gehalt an CO in der Atmosphäre von zentraler Bedeutung, sondern v.a. auch das Verhältnis von CO zu Sauerstoff O₂ (Meyer et al. 2000).

Eine wichtige Senke für CO stellt dessen Umsetzung durch Mikroorganismen dar. Carboxidotrophe Bakterien sind in der Lage, unter chemolithoautotrophen Bedingungen aerob mit CO als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle zu wachsen. Somit tragen sie erheblich zur Reduzierung der atmosphärischen CO-Konzentration auf ein ungefährliches Niveau bei. Schätzungen gehen davon aus, dass carboxidotrophe Mikroorganismen im Jahr ungefähr 1×10^8 Tonnen CO aus der unteren Atmosphäre und aus dem Boden entfernen (Hegeman 1980; Fontecilla-Camps und Ragsdale 1999). Carboxidotrophe Bakterien bilden eine insgesamt sehr heterogene Gruppe, die Gattungen wie *Pseudomonas*, *Oligotropha*, *Arthrobacter*, *Alkaligenes* oder *Bacillus* umfasst. Im Zuge des carboxidotrophen Stoffwechsels wird CO zu CO₂ oxidiert, die dabei freigesetzten Elektronen können für Wachstumsprozesse verwendet werden (Meyer und Rohde 1984), während das entstehende CO₂ assimiliert wird.

1.2 Das carboxidotrophe Bakterium *Oligotropha carboxidovorans*

Carboxidotrophe Bakterien bilden taxonomisch eine sehr diverse physiologische Gruppe (Meyer und Rohde 1984) und kommen ubiquitär in der Natur vor. *Oligotropha carboxidovorans* (früher *Pseudomonas carboxydovorans*) ist ein Vertreter der carboxidotrophen Bakterien, *Oligotropha carboxidovorans* OM5 der Referenzstamm für die

Gattung *Oligotrophia* (Meyer et al. 1993b). Es handelt sich dabei um aerob wachsende, Gram-negative, leicht gekrümmte Stäbchen, die zur α -Unterklasse der Proteobacteria (Auling et al. 1988; Meyer 2005) gehören. *Oligotrophia carboxidovorans* ist in der Lage, chemolithoautotroph im Mineralmedium mit CO als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen (Meyer und Rohde 1984). Die Anzucht kann unter einer Atmosphäre von 40 % CO, 5 % CO₂ und 55 % Luft erfolgen. Des Weiteren wächst das Bakterium chemolithoautotroph mit H₂ und CO₂ sowie heterotroph mit organischen Substraten (Meyer und Schlegel 1978).

Die bei der Oxidation von CO (als auch H₂) freiwerdenden Elektronen werden auf das Elektronentransport-System (ETS) der Membran übertragen. Studien mit artifiziellen Elektronenakzeptoren zeigten dabei, dass Ubichinone im physiologischen System diese Funktion übernehmen könnten (Meyer und Schlegel 1980; Kim und Hegeman 1981a, 1981b). *O. carboxidovorans* besitzt eine verzweigte Atmungskette (Abb. 1-1). Auf diese Weise kann verhindert werden, dass CO an die terminale Oxidasen bindet und so die Atmungskette inhibiert wird. Nach Cypionka und Meyer (1983) könnte die Aufspaltung dabei auf dem Niveau von Cytochrom b oder Ubichinon erfolgen und in einen heterotrophen und einen autotrophen Ast münden. Der heterotrophe, CO-sensitive Ast, welcher aus den Cytochromen b₅₅₈, c und a₁ (als terminaler Oxidase) besteht, erhält vorwiegend die Elektronen aus der Umsetzung organischer Substrate, während der autotrophe Zweig CO-insensitiv ist und die Elektronen aus der Oxidation von CO oder H₂ bezieht. Diese Insensitivität gegenüber CO ist dabei eine konstitutive Eigenschaft von carboxidotrophen Organismen, die Bildung CO-insensitiver terminaler Oxidasen wird nicht durch CO induziert (Cypionka und Meyer 1982).

Entgegen Cypionka und Meyer (1983), welche davon ausgingen, dass das Cytochrom b₅₆₁ der physiologische Elektronenakzeptor ist, identifizierten Wilcoxon et al. (2011b) den Chinonpool als Primärakzeptor der aus der Oxidation von CO freigesetzten Elektronen. Die Arbeitsgruppe untersuchte die Reaktion reduzierter Kohlenmonoxid-Dehydrogenase (CODH) mit verschiedenen Chinon-Spezies. Letztere erwiesen sich als katalytisch kompetent, wohingegen Cytochrome nicht durch CO/CODH reduziert werden konnten. Diese Befunde lassen darauf schließen, dass die im Zuge der CO-Oxidation entstehenden Reduktionsäquivalente direkt auf den Chinonpool übertragen werden und nicht auf ein Cytochrom als Intermediat (Wilcoxon et al. 2011b). Cytochrom b₅₆₃ wurde als CO-insensitive terminale Oxidase identifiziert. Es handelt sich dabei um ein Cytochrom o, der wichtigsten terminalen Oxidase in bakteriellen Atmungssystemen. Die biochemischen und

spektralen Eigenschaften lassen auf die Existenz mehrerer Klassen schließen (Jurtshuk et al. 1980).

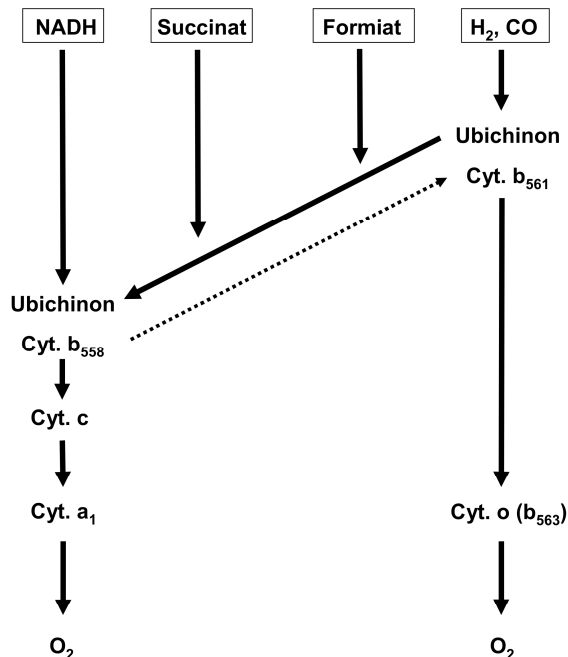


Abbildung 1-1: CO-insensitive und CO-sensitive Elektronentransportkette in *O. carboxidovorans* (nach Cypionka und Meyer 1983).

Die Elektronentransportkette in *O. carboxidovorans* weist einen CO-sensitiven und einen CO-insensitiven Zweig auf. Ersterer bezieht die Elektronen aus der Oxidation organischer Substrate, letzter aus der Oxidation von H₂ und CO (Cypionka und Meyer 1983). Ubichinon konnte als Primärakzeptor der Elektronen aus der CO-Oxidation identifiziert werden (Wilcoxon et al. 2011b)

Kim und Hegeman (1981a, 1983) schlugen für *Pseudomonas carboxydohydrogena* ein vergleichbares Elektronentransport-System vor, welches ebenfalls ein Cytochrom o als terminale Oxidase aufwies. Im Gegensatz zu der von Cypionka und Meyer (1983) beschriebenen Atmungskette für *O. carboxidovorans* (vgl. Abb. 1-1) tritt die Verzweigung allerdings nicht auf dem Niveau von Cytochrom b oder Ubichinon auf, sondern auf dem von Cytochrom c (Kim und Hegeman 1983).

Reduzierte Pyridinnukleotide werden über einen rückläufigen Elektronentransport erzeugt, obgleich das Potential des Redoxpaares CO/CO₂ mit -540 mV hierfür negativ genug wäre (Meyer und Schlegel 1983). NAD(P)H wird über eine „proton motive force“ generiert, welche nicht von ATP-Hydrolyse getrieben wird (Jacobitz et al. 1986). Das Endprodukt der CO-Oxidation ist CO₂, welches schließlich als Kohlenstoffquelle dient. Es wird in den CBB (Calvin-Benson-Bassham)-Zyklus eingeschleust und dient dem Aufbau von Zellmasse (Futo und Meyer 1986).

1.3 Das DNA-Megaplasmid pHCG3 aus *O. carboxidovorans*

Die für das carboxidotrophe sowie hydrogenotrophe Wachstum erforderlichen Gene liegen auf dem DNA-Megaplasmid pHCG3 (Abb. 1-2). Es handelt sich dabei um ein zirkuläres *low copy* Plasmid mit einer Größe von 133 kbp, welches bereits vollständig sequenziert wurde. Der G+C - Gehalt des Plasmids entspricht in etwa dem des Chromosoms von *O. carboxidovorans*, weshalb auch angenommen wird, dass *O. carboxidovorans* der Ursprungswirt ist (Fuhrmann et al. 2003). Das Plasmid weist 125 open reading frames (ORF) auf und beherbergt die Gencluster *cox*, *cbb* und *hox*, welche zusammen einen 51,2 kb großen Chemolithoautotrophie-Modul bilden. Der *hox*-Gencluster (23,35 kb) umfasst dabei 18 Gene für das Wachstum mit H₂, *cbb* (13,33 kb) enthält die Gene für die CO₂-Fixierung im CBB-Zyklus (Meyer et al. 1993a; Santiago und Meyer 1997). Der *cox*-Gencluster mit seinen 12 Genen *coxBCMSLDEFGHIK* wird nur in Gegenwart von CO exprimiert und ermöglicht dessen Nutzung als Energie- und Kohlenstoffquelle (Carboxidotrophie) (Schübel et al. 1995; Santiago et al. 1999; Fuhrmann et al. 2003).

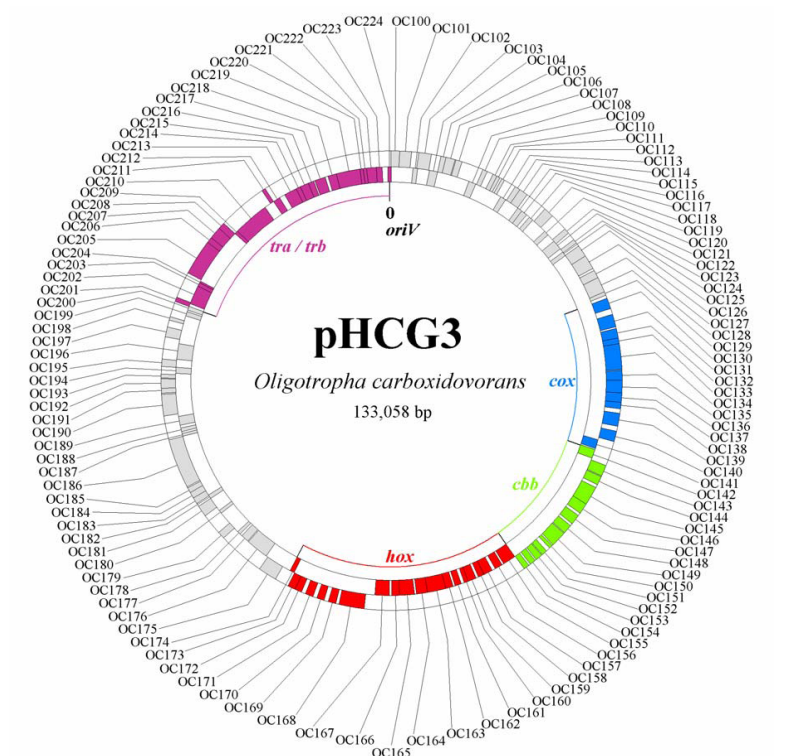


Abbildung 1-2: Das *low copy* Megaplasmid pHCG3 aus *O. carboxidovorans* OM5 (Fuhrmann et al. 2003).

Die auf dem 133 kb großen Megaplasmid pHCG3 enthaltenen Gencluster *cox* (blau), *hox* (rot) und *cbb* (grün) bilden einen Chemolithoautotrophie-Modul. Der *cox*-Gencluster kodiert dabei für Gene für die chemolithoautotrophe Nutzung von CO, der *hox*-Gencluster für die Verwertung von H₂. Der *cbb*-Cluster enthält Gene zur CO₂-Fixierung. Darüber hinaus sind die Gene für den konjugativen Transfer gekennzeichnet (*tra/trb*-Cluster, pink).

Das für die Nutzung von CO maßgebliche Enzym, die CO-Dehydrogenase, wird durch die Strukturgene *coxMSL* kodiert. Die Gene des stromabwärts gelegenen Subclusters *coxDEFG* spielen eine Rolle bei der posttranslationalen Reifung des Metallclusters im aktiven Zentrum der CO-Dehydrogenase (Meyer et al. 2000; Pelzmann et al. 2009). Auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen der CO-Dehydrogenase und den Genen des Subclusters *coxDEFG* kann auch deswegen geschlossen werden, weil die Strukturgene *coxMSL* und die des Subclusters transkriptionell nahe beieinander liegen (Santiago et al. 1999). Von *coxBCHK* wird angenommen, dass sie Transmembranproteine kodieren, da sie N-terminale, transmembrane Sequenzen enthalten (Fuhrmann et al. 2003). Die Transkription von *coxK* erfolgt gegen den Uhrzeigersinn, im Genprodukt von *coxI* wird ein cytoplasmatisches Protein vermutet (Abb. 1-3).

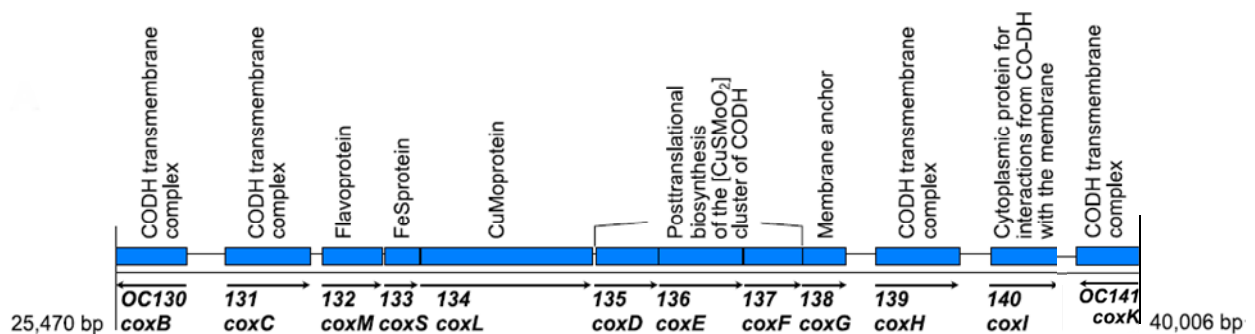


Abbildung 1-3: Struktur des *cox*-Genclusters auf dem 133-kb Megaplasmid pHCG3 von *Oligotropha carboxidovorans* OM5 mit den vorhergesagten Funktionen (Fuhrmann et al. 2003).

Der *cox*-Gencluster enthält mit *coxMSL* die Struktur-Gene für die verschiedenen Untereinheiten der CO-Dehydrogenase. Die Genprodukte des Subclusters *coxDEFG* haben eine Funktion in der posttranslationalen Reifung des Enzyms bzw. dessen aktiven Zentrums. Die entsprechenden Gene liegen stromabwärts der Strukturgene. Die Transkription des gesamten Clusters erfolgt ausschließlich in Gegenwart von CO (Santiago et al. 1999).

Das Gesamtgenom von *O. carboxidovorans* OM5 wurde in den letzten Jahren zweimal unabhängig voneinander sequenziert. So weist das Chromosom nach Paul et al. (2008, 2010) 3,746 Mbp auf und enthält 3.754 mögliche Leseraster. Der G+C - Gehalt konnte zu 62,4 % bestimmt werden. Abgesehen vom Megaplasmid pHCG3 konnten keine weiteren Plasmide ermittelt werden. Wie bereits von Fuhrmann et al. (2003) beschrieben, enthält das *low copy* Megaplasmid die Gene für die chemolithoautotrophe Nutzung von CO und CO₂ (Carboxidotrophie), H₂ und CO₂ (Hydrogenotrophie) und CO₂-Fixierung unter aeroben Bedingungen. Auf dem Chromosom konnten demgegenüber Gene identifiziert werden, welche für (Schlüssel-) Enzyme im Stoffwechsel kodieren. Diese erfüllen zentrale Aufgaben im Energie-Metabolismus, in der Biosynthese von Fett- und Aminosäuren, in der Nukleotid-Synthese, in der Transkription, im DNA-Metabolismus sowie in der Synthese und im Abbau von Proteinen. Darüber hinaus wurden Gene für das heterotrophe Wachstum mit organischen Säuren wie u.a. Formiat, Acetat, Pyruvat, Lactat, Malat und Succinat identifiziert.

Die Genomsequenzierung von *O. carboxidovorans* OM4 und die Resequenzierung des Stammes OM5 durch Volland et al. (2011) ergab im Gegensatz dazu, dass beide Genome aus jeweils einem Chromosom und zwei Plasmiden bestehen. Der Stamm OM5 enthält demnach ein 3,595 Mbp umfassendes Chromosom, das 133 kbp Megaplasmid pHCG3 sowie ein weiteres 167 kbp Plasmid pOC167. Die Anzahl der Replikons vom OM4 entspricht der von OM5. Der Stamm OM4 weist ein 3,539 Mbp großes Chromosom auf, sowie zwei Plasmide mit 133 kbp (pHCG3b) und 167 kbp (pOC167b). Die Sequenzen von pOC167 und pOC167b sind identisch, diejenigen von pHCG3 und pHCG3b unterscheiden sich lediglich in 5 Basen. Das Chromosom von OM5 unterscheidet sich dagegen in zwei Regionen vom OM4 - Chromosom. So enthält eine 7,7 kb - Region hypothetische und Phagen - verwandte Gene, die darauf schließen lassen, dass es sich um einen Prophagen handelt. Eine 53 kb - Region weist Gencluster für die dissimilatorische Nitrat-Reduktion (*narGHJ*), die Reduktion von Stickoxiden sowie für Transporter und biosynthetische Proteine auf. Phagen - verwandte Gene konnten nicht gefunden werden. Die korrespondierende Region auf dem OM4 - Chromosom enthält demgegenüber nur das *narI* - Gen, verschiedene Transposase- und Integrase-Gene sowie ein unterbrochenes „Pseudogen“, welches in OM5 allerdings vollständig vorliegt. Diese Befunde erlauben die Spekulation, dass es sich bei OM5 um den „Vorfahren“ von OM4 handelt (Volland et al. 2011). Der wesentliche Unterschied dieser jüngsten Sequenzierung besteht allerdings darin, dass die Sequenz des Plasmids pOC167 vormals dem Chromosom zugeordnet wurde. Sowohl pOC167 (Stamm OM5) als auch pOC167b (Stamm OM4) kodieren für typische Plasmid-kodierte Komponenten wie Proteine

zur Initiation der Replikation (RepA, RepB und RepC), Transport-Proteine, Efflux-Pumpen, Resistenz-Proteine sowie Bestandteile des Type IV - Sekretionssystems. Darüber hinaus konnten zwei Regionen (16,5 und 4,2 kbp) identifiziert werden, die einen hohen Homologie-Grad zu entsprechenden Regionen (18 und 4,5 kbp) auf dem Chromosom aufweisen. Diese Bereiche scheinen somit für homologe Rekombinationen geeignet zu sein (Volland et al. 2011). Die pOC167 - Sequenz wurde bei der Sequenzierung des OM5 - Genoms durch Paul et al. (2008, 2010) entsprechend in diese Region des Chromosoms integriert.

1.4 Die drei Klassen mononuklearer Molybdoenzyme

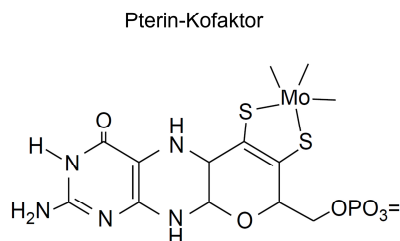
Eine Vielzahl von Übergangsmetallen dient in biologischen Systemen dazu, die katalytische Diversität zu erhöhen. Dabei werden Übergangsmetalle häufig direkt an Aminosäure-Reste wie Histidine, Cysteine, Serine oder Tyrosine koordiniert, oder aber sie werden als Teil größerer prosthetischer Gruppen in organische Komponenten inkorporiert (Holm et al. 1996). Das Spurenelement Molybdän zeichnet sich aufgrund der guten Löslichkeit von Molybdaten in Wasser durch eine relativ leichte Verfügbarkeit aus. In biologischen Systemen ist Molybdän v.a. dadurch von Bedeutung, dass es unter physiologischen Bedingungen redox-aktiv ist und Oxidationsstufen von +IV bis +VI einnehmen kann. So kann Molybdän als Elektronenüberträger zwischen Redoxsystemen dienen, insbesondere zwischen Ein-Elektron- und Zwei-Elektronen-Systemen (Pilato und Stiefel 1999). Die physiologischen Funktionen sind vielfältig und beinhalten die Katalyse von Schlüsselreaktionen im Kohlenstoff-, Stickstoff- und Schwefel-Metabolismus (Hille 1996; Pilato und Stiefel 1999; Zhang und Gladyshev 2008).

Molybdän kann in biologischen Systemen in zwei grundlegenden Formen gefunden werden: Als integraler Bestandteil multinuklearer Metallzentren in Nitrogenasen oder als mononukleare *active site* einer diversen Gruppe von Enzymen, die im Transfer eines Sauerstoff-Atoms katalytisch funktionell sind (Howard und Rees 1996; Burgess und Lowe 1996). Im Gegensatz zu den multinuklearen Fe/Mo-Zentren in bakteriellen Nitrogenasen ist ein Pterin-Kofaktor integraler Bestandteil des aktiven Zentrums. Dieser Kofaktor (Pyranopterin, Abb. 1-3) koordiniert das Metall über eine Dithiolat-Seitenkette (Mendel und Schwarz 1999) und wird über Wasserstoffbrücken-Bindungen im Protein verankert (Hille 1996; Zhang und Gladyshev 2008; Dobbek 2011). Im Gegensatz zu Eukaryonten erscheint der Kofaktor in prokaryontischen Organismen als Dinukleotid des Cytosin, Guanin

oder Adenin (Krüger und Meyer 1986, 1987; Johnson et al. 1990; Mendel und Schwarz 1999, 2002). So charakterisierten Krüger und Meyer (1986, 1987) den Pterin-Kofaktor aus der Kohlenmonoxid-Dehydrogenase von *Pseudomonas carboxydoflava* und bezeichneten ihn zunächst als Bactopterin, welches sich u.a. in der molekularen Masse als auch im Phosphatgehalt und in der Stabilität deutlich vom bisher bekannten Molybdopterin unterschied. Mittels Alkylierungsstudien und der Isolierung der entsprechenden Carboxamidomethyl-Derivate konnten Johnson et al. (1990) den Kofaktor schließlich als Molybdopterin-Cytosin-Dinukleotid (MCD) identifizieren.

Mononukleare Molybdoenzyme können aufgrund von Homologien in ihren Strukturen und ihren spektroskopischen Eigenschaften in drei verschiedene Familien unterteilt werden (Abb. 1-4), wobei jede eine charakteristische *active site* besitzt und einen bestimmten Reaktionstyp katalysiert: die Familie der Molybdän-Hydroxylasen oder Xanthin-Oxidasen, die Familie der Sulfid-Oxidasen und die Dimethylsulfoxid (DMSO) - Reduktase-Familie (Hille 1996, 2002, 2013; Mendel et al. 2007; Dobbek 2011; Hille et al. 2014).

A



B

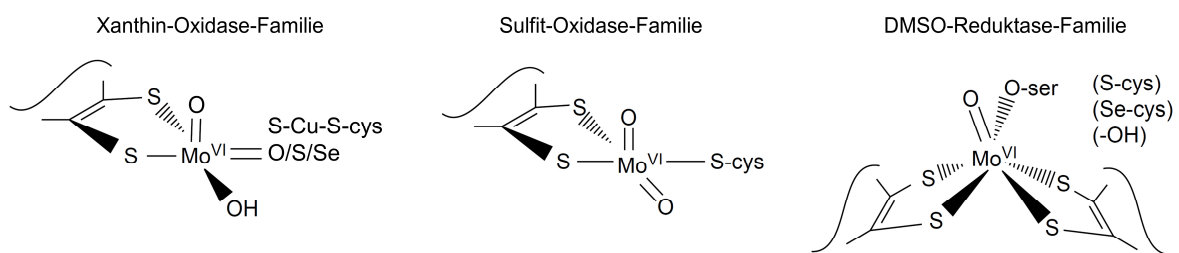


Abbildung 1-4: Struktur des Pterin-Kofaktors (A) sowie der drei Familien der mononuklearen Molybdoenzyme (B) (verändert nach Hille 1996).

Dargestellt ist die Struktur des Pyranopterin-Kofaktors (in der Tetrahydroform) mit gebundenem Molybdän (A). Es handelt sich dabei um einen organischen Trizyklus, welcher über eine Endithiolat-Gruppe das anorganische Molybdän komplexiert. Im Gegensatz zu eukaryontischen Organismen besitzen Prokaryonten den Kofaktor als Dinukleotid des Cytosin, Guanin oder Adenin (Krüger und Meyer 1986, 1987; Johnson et al. 1990; Mendel und Schwarz 1999, 2002). Die drei Molybdän-haltigen Enzymfamilien (B) sind beispielhaft dargestellt anhand der Struktur des aktiven Zentrums von Xanthin-Oxidase, Sulfid-Oxidase und Dimethylsulfoxid-Reduktase (Hille 1996).

Mitglieder der Xanthin-Oxidase-Familie (Xanthin-Oxidase, Aldehyd-Oxidase, Aldehyd-Oxidoreduktase) zeigen eine $\text{LMO}^{\text{VI}}\text{OS(OH)}$ -Struktur im oxidierten Zustand, wobei L für ein Äquivalent des Pterin-Kofaktors steht (Hille 1996). Sie besitzen einen apikalen Oxo-Liganden am Molybdän sowie in äquatorialer Position einen Oxo- oder Hydroxo-Liganden. Typische Reaktionen sind die Hydroxylierung von Kohlenstoff-Zentren nach folgendem Schema: $\text{R-H} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ROH} + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+$. Im Gegensatz zu Monooxygenasen ist die Quelle der inserierten Hydroxylgruppe jedoch nicht molekularer Sauerstoff sondern Wasser, und Redox-Äquivalente werden erzeugt und nicht verbraucht (Hille 2005; Brondino et al. 2006). Die apikale Oxo-Gruppe am Molybdän ist an der Katalyse selbst nicht beteiligt, während der äquatoriale Oxo/Hydroxo-Ligand katalytisch aktiv, labil und austauschbar ist. Molybdän-Hydroxylasen besitzen zudem einen weiteren Liganden, bei dem es sich um eine Oxo-Gruppe (Aldehyd-Oxidoreduktase aus *Desulfovibrio gigas*), eine Sulfido-Gruppe (Xanthin-Dehydrogenase) oder eine Selenido-Gruppe (Nicotinat-Dehydrogenase aus *Eubacterium barkeri*) handelt (Santos-Silva et al. 2009; Dobbek 2011). Die zur Xanthin-Oxidase-Familie zählende bimetallische CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* stellt eine Ausnahme dar (vgl. Kap. 1.5.2 und 1.6), da das aktive Zentrum neben Molybdän ein Kupfer-Ion als zweites Metall besitzt. Sowohl die Aminosäure-Sequenz als auch der Gehalt an Kofaktoren und die Quartärstruktur weisen auf eine evolutionäre Nähe zur Familie der Molybdän-Hydroxylasen hin (Schübel et al. 1995; Dobbek et al. 1999).

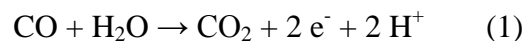
Die zweite Familie umfasst Sulfite-Oxidase und Nitrat-Reduktasen aus Pflanzen, welche Nitrat aus dem Boden assimilieren. Ursprünglich wurden nur eukaryontische Enzyme zu dieser Familie gezählt, es konnten jedoch mit der Sulfite-Dehydrogenase aus *Starkeya novella* und dem Enzym YedY aus *Escherichia coli* zwei prokaryontische Enzyme gefunden werden, die eindeutige Homologien zu den eukaryontischen Vertretern dieser Familie aufweisen und daher auch zur Sulfite-Oxidase-Familie gezählt werden (Dobbek 2011). Wie bei den Molybdän-Hydroxylasen besitzt auch hier das Metallzentrum nur ein einziges Pterin-Kofaktor-Äquivalent. Das Zentrum mit der Struktur $\text{LMO}^{\text{VI}}\text{O}_2(\text{S-Cys})$ im oxidierten Zustand besitzt eine Oxo-Gruppe in apikaler Position und unterscheidet sich v.a. dadurch von dem der Molybdän-Hydroxylasen, dass an äquatorialer Position ein Cystein-Ligand direkt mit dem Molybdän-Ion verbunden ist. Enzyme der Sulfite-Oxidase-Familie katalysieren den Transfer eines Sauerstoff-Atoms auf geeignete Substrate (Hille 1996).

Die Familie der DMSO-Reduktasen stellt eine in Struktur und Funktion sehr diverse Gruppe dar. Dennoch ist allen Mitgliedern gemeinsam, dass das Molybdän an zwei Äquivalenten des Pterin-Kofaktors gebunden ist. Zusätzlich besitzt das Metall in der Regel

noch einen apikalen Oxo- (oder Sulfido-)Liganden sowie als 6. Liganden einen Serin-Rest, einen (Seleno-)Cystein-Rest oder eine Hydroxo-Gruppe. Das aktive Zentrum stellt sich damit als $L_2Mo^{VI}(O/S)X$ dar (wobei es sich bei X um den variablen Liganden handelt). Die Enzyme kommen in Bakterien und Archäen vor und katalysieren den Transfer von Sauerstoff-Atomen sowie Dehydrogenase-Reaktionen (Krafft et al. 1992; Hille 1996; Kniemeyer und Heider 2001; Dobbek 2011).

1.5 CO-Dehydrogenasen als Schlüsselenzyme im CO-Stoffwechsel

Eine Vielzahl aerober und anaerober Bakterien ist in der Lage, CO als Energie- und Kohlenstoffquelle zu nutzen (Ferry 1995; Moersdorf et al. 1992). Das hierfür entscheidende Schlüsselenzym, die CO-Dehydrogenase (CODH), katalysiert die Oxidation von CO nach folgender Gleichung (Ragsdale und Kumar 1996; Meyer et al. 2000):



Zwei grundsätzliche Typen an CO-Dehydrogenasen können unterschieden werden: Mo- und Cu-haltige CO-Dehydrogenasen aerober Bakterien wie *O. carboxidovorans* (Meyer et al. 2000; Dobbek et al. 2002) und Ni- und Fe-haltige CO-Dehydrogenasen verschiedener Gruppen anaerober Bakterien und Archaeen (Ferry 1995; Dobbek et al. 2001; Lindahl 2002; Drennan und Peters 2003).

1.5.1 NiFe-Kohlenmonoxid-Dehydrogenasen

Kohlenmonoxid-Dehydrogenasen mit einem NiFe-Zentrum erfüllen Funktionen sowohl im katabolen als auch im anabolen Stoffwechsel. Sie sind phylogenetisch verwandt, zeigen untereinander jedoch Unterschiede hinsichtlich ihrer Rolle im Stoffwechsel, ihrer Untereinheiten-Struktur sowie der katalytischen Aktivität. Es kann eine Einteilung in monofunktionale und bifunktionale Enzyme vorgenommen werden. Während erstere im Zuge der CO-Oxidation eine zentrale Rolle beim Aufbau eines Protonengradienten oder der Generierung reduzierter Pyridin-Nukleotide (NADPH) besitzen, katalysieren letztere im Komplex mit der Acetyl-CoA-Synthase (ACS) die Reduktion von CO_2 und stellen damit CO für die Synthese von Acetyl-CoA zur Verfügung (Doukov et al. 2002; Lindahl 2002).

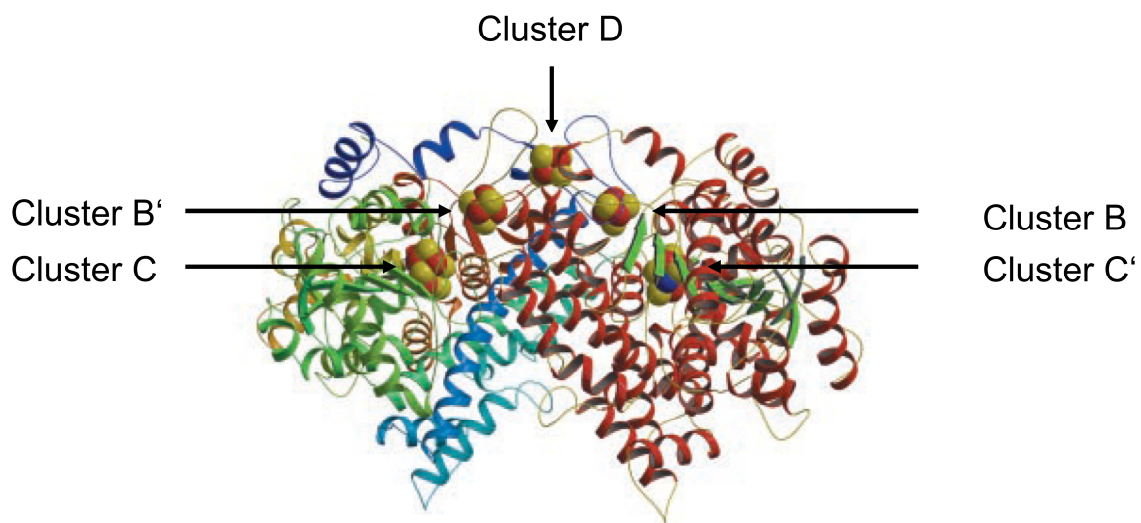
Nach Lindahl und Chang (2001) lassen sich Ni-haltige CO-Dehydrogenasen in vier Klassen einteilen: Zu den Enzymen der Klasse I zählen ACS/CODHs aus obligaten autotrophen Methanogenen. Im Komplex mit ACS wird dabei die Synthese von Acetyl-CoA im Zuge des Wachstums mit CO₂ und H₂ katalysiert. Die Enzyme der Klasse II (ebenfalls ACS/CODHs) sind an der acetoklastischen Methanogenese beteiligt. Die Enzyme beider Klassen sind aus fünf verschiedenen Untereinheiten (α , β , γ , δ und ε) zusammengesetzt. ACS/CODHs der Klasse III werden in homoacetogenen Organismen gefunden und bestehen aus zwei unabhängigen Proteinen, wovon eines ein $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer darstellt (ACS/CODH), während es sich bei dem anderen um ein $\gamma\delta$ -Heterodimer (CoFeSP) handelt. Die Untereinheiten der Klasse III - Enzyme sind darüber hinaus zumindest teilweise homolog zu denen der Klassen I und II. Bei den Enzymen der Klasse IV handelt es sich um monofunktionale α_2 -Homodimere. Diese werden in anaeroben CO-verwertenden Bakterien wie *Rhodospirillum rubrum* oder *Carboxydotherrnus hydrogenoformans* gefunden und katalysieren ausschließlich die CO/CO₂-Redoxreaktion (Drennan et al. 2001; Lindahl und Chang 2001).

In *Carboxydotherrnus hydrogenoformans* wird die Oxidation von CO von zwei monofunktionalen NiFe CO-Dehydrogenasen (Typ I und II) katalysiert (Svetlitchnyi et al. 2001), während eine dritte in einem Komplex mit Acetyl-CoA-Synthase in der autotrophen Kohlenstoff-Assimilation involviert ist (Svetlitchnyi et al. 2004). Die CO-Dehydrogenasen vom Typ I und II (CODH I bzw. CODH II) besitzen die bereits erwähnte homodimere α_2 -Untereinheitenstruktur und sind mit der Innenseite der Membran verankert (Svetlitchnyi et al. 2001). Die Elektronen, welche bei der CO-Oxidation durch CODH I frei werden, führen zur Translokation von Protonen durch eine Komplex I - verwandte Hydrogenase. CODH II hat eine Schlüsselfunktion in der Bereitstellung von Reduktionskraft und CO₂ für die Kohlenstoff-Assimilation. Beide CO-Dehydrogenasen unterscheiden sich geringfügig in ihren Massen (137,0 bzw. 136,6 kDa) und stehen immunologisch nicht zueinander in Beziehung (Svetlitchnyi et al. 2001).

Die Kristallstruktur der CODH II konnte mit einer Auflösung von 1,63 Å gelöst werden (Abb. 1-5, A) (Dobbek et al. 2001). Beide Untereinheiten sind kovalent miteinander verknüpft. Ferner konnten insgesamt 5 Metallcluster ausgemacht werden. So enthält jede Untereinheit einen asymmetrischen [Ni-4Fe-5S] - Cluster (C bzw. C') sowie einen [4Fe-4S] - Cluster (B bzw. B'). Am Interface beider Untereinheiten befindet sich ein weiterer [4Fe-4S] - Cluster (D) (Dobbek et al. 2001). Cluster C und C' bilden die aktiven Zentren des Enzyms und damit den Ort der CO-Oxidation. Die frei werdenden Elektronen werden über

zwei getrennte Elektronentransport-Wege zum Brückencluster D geleitet. So findet der Transfer von Elektronen vom Cluster C der einen Untereinheit über den Cluster B' der anderen Untereinheit statt. Elektronen von Cluster C' fließen entsprechend über Cluster B zum Brückencluster D. Jede Untereinheit ist damit am Elektronentransport der jeweiligen anderen Untereinheit mit-involviert (Abb. 1-5, B). Vom Cluster D, welcher zur Proteinoberfläche gerichtet ist, fließen die Elektronen schließlich zu externen Akzeptoren (Dobbek et al. 2001).

A



B

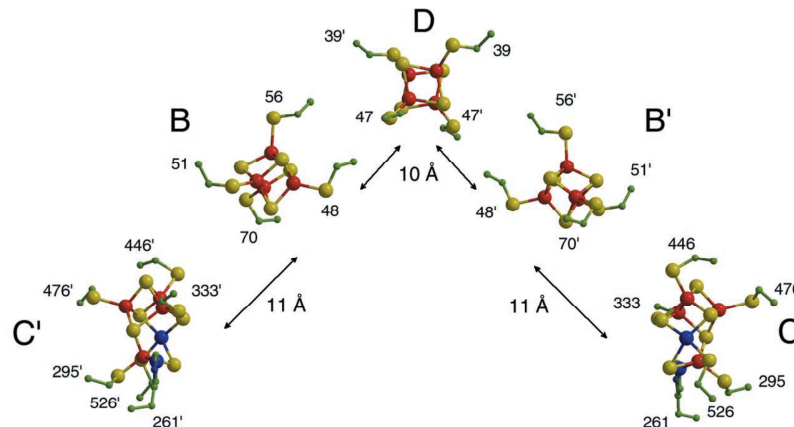


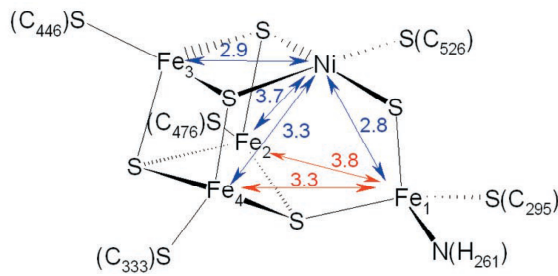
Abbildung 1-5: Kristallstruktur der homodimeren CODH II aus *C. hydrogeniformans* und Anordnung der Cluster für den Elektronen-Transfer (aus Dobbek et al. 2001).

(A) Struktur der CODH II aus *C. hydrogeniformans* bei einer Auflösung von 1,63 Å. Die Untereinheiten sind verschiedenfarbig dargestellt. Die linke Untereinheit ist am N-Terminus blau gefärbt und geht über grün und gelb zum rot gefärbten C-Terminus über. Die rechte Untereinheit ist gemäß der Sekundärstruktur-Elemente gefärbt. α -Helices sind rot dargestellt, β -Faltblätter in grün. Ferner sind die verschiedenen Cluster gekennzeichnet.

(B) Elektronentransport-Wege in der CODH II. Die Cluster C und C' stellen die aktiven Zentren des Enzyms dar. Die bei der Oxidation von CO frei werdenden Elektronen werden von Cluster C über Cluster B' zum Brückencluster D am Interface beider Untereinheiten geleitet. Analog erfolgt der Elektronen-Transfer von Cluster C' über den Cluster B. Die Cluster sind als Kugel-Stab-Modelle dargestellt, Fe-Atome sind rot, S-Atome gelb und Ni-Atome in blau dargestellt.

Die [Ni-4Fe-5S] - Cluster bilden die aktiven Zentren der CODH II (Abb. 1-6). Das Nickel-Ion ist dabei in einen [3Fe-4S] - Subcluster integriert, was zu einer leicht verzerrten würfelförmigen Geometrie eines [4Fe-4S] - Clusters führt (Dobbek et al. 2001). Röntgenabsorptionsspektroskopie bestätigte, dass das Nickel-Ion von vier quadratisch angeordneten Schwefelatomen koordiniert wird (Gu et al. 2004). Über zwei anorganische μ_3 -Schwefel ist Ni schließlich an die Fe-Atome des [3Fe-4S] - Subclusters gebunden. Der organische γ -Schwefel des Cystein⁵²⁶ stellt den dritten Schwefelliganden des Nickel-Ions dar, ein anorganischer μ_2 -Schwefel den vierten Liganden, welcher das Nickel-Ion mit einem weiteren Fe-Atom (Fe1) verbrückt und den [Ni- μ_2 S-Fe1] - Subcluster bildet. Nach bisherigen Untersuchungen vollzieht sich die Oxidation von CO am [Ni- μ_2 S-Fe1] - Subcluster (Dobbek et al. 2001). So zeigt die Kristallstruktur der CODH II einen Substrat-Kanal, über welchen das CO zum aktiven Zentrum gelangt. Dieser „Tunnel“ endet unmittelbar oberhalb des Nickel-Ions. Es wird davon ausgegangen, dass das CO an der freien apikalen Bindestelle des quadratisch-planar koordinierten Nickel-Ions bindet (Abb. 1-6, B). Auf diese Weise entsteht ein Ni-Carbonyl-Intermediat mit einer quadratisch-pyramidalen Geometrie. Am tetraedrisch koordinierten Fe1 bindet H₂O als Hydroxygruppe (DeRose et al. 1998). Der Abstand zwischen dem CO und der OH-Gruppe ist für eine Interaktion allerdings zu groß, so dass es zu einer Liganden-Umlagerung kommen muss. Es folgt der nukleophile Angriff der Hydroxylgruppe auf das CO, welcher über ein Ni-C(O)O-Fe - Intermediat zur Oxidation der Carbonyl-Gruppe am Ni führt. Das Ni verbleibt während des gesamten Reaktionszyklus dabei in der Oxidationsstufe +2 (Amara et al. 2011). Nach der Freisetzung von CO₂ weist der C-Cluster diesem Mechanismus zufolge zunächst ein Ni-gebundenes Hydrid auf, welches in Form eines Protons (durch Verlust von zwei Elektronen) abgespalten wird. Ein alternatives Modell hierzu geht von einem intermediären Ni⁰ aus, welches schließlich oxidiert wird. (Volbeda und Fontecilla-Camps 2005; Jeoung und Dobbek 2007; Kung und Drennan 2011).

A



B

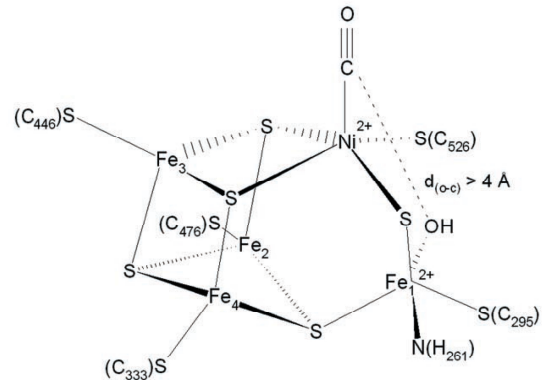


Abbildung 1-6: Struktur des [Ni-4Fe-5S] - Clusters von CODH II aus *C. hydrogenoformans* und Struktur-basiertes Modell der CO-Bindung und Initiation der CO-Oxidation (aus Dobbek et al. 2001).

(A) Schematische Darstellung des [Ni-4Fe-5S] - Clusters (Cluster C) von CODH II aus *C. hydrogenoformans*. Ni-Fe-Distanzen sind in blau, Fe-Fe-Distanzen in rot dargestellt. Die kurzen Abstände zwischen Ni und Fe1 sowie Ni und Fe3 veranschaulichen die Integration des Nickel-Ions in den Cluster.

(B) Das Modell der CO-Oxidation geht davon aus, dass letzteres an der freien und zugänglichen apikalen Koordinationsstelle des Nickel-Ions bindet. Dies führt zu einer quadratisch-pyramidalen Koordination des Ni mit einer Geometrie, die häufig bei fünffach koordinierten Ni-Komplexen zu finden ist. Die Bindung von OH erzeugt eine trigonal-bipyramidale Geometrie am Fe1. Der Abstand des CO zur OH-Gruppe mit mehr als 4 Å erlaubt zunächst keine Interaktionen. Eine Rearrangierung der quadratisch-pyramidalen Ni-Koordination in eine trigonal-bipyramidale Geometrie ‚bewegt‘ das CO in Richtung der OH-Gruppe und ermöglicht den nukleophilen Angriff.

Die Röntgenstruktur der NiFe CO-Dehydrogenase aus *Rhodospirillum rubrum* konnte mit einer Auflösung von 2,8 Å gelöst werden (Drennan et al. 2001). Die erhaltene Struktur entspricht dabei im Wesentlichen derjenigen aus *C. hydrogenoformans*. Der einzige signifikante Unterschied ergibt sich für den C-Cluster (Abb. 1-7). Das Ni ist hier integraler Bestandteil eines NiFe₃S₄-Clusters, welcher mit einem mononuklearen Fe (FCII, ferrous component II site) verbrückt ist (Drennan et al. 2001; Jeon et al. 2005).

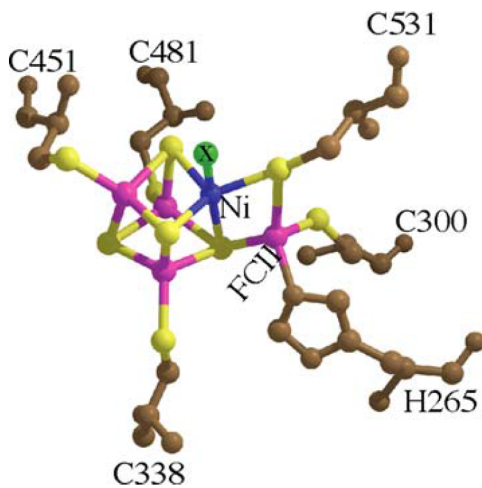


Abbildung 1-7: Modell der dreidimensionalen Struktur des C-Clusters der CO-Dehydrogenase aus *Rhodospirillum rubrum* (aus Jeon et al. 2005).

Aus der Röntgenstruktur (2,8 Å Auflösung) ergibt sich ein NiFe_4S_4 -Cluster, welcher von Histidinen und Cysteinen koordiniert wird. Das Ni-Atom ist Teil eines NiFe_3S_4 -Kubus, welcher mit der FCII site verbrückt ist. Fe-Atome sind in magenta, S-Atome in gelb und Ni-Atome in blau dargestellt. Der Ligand des Ni (höchstwahrscheinlich CO) ist in grün wiedergegeben, alle anderen Atome in braun.

Die Unterschiede in den C-Cluster-Strukturen der CODHs aus *C. hydrogenoformans* und *R. rubrum* könnten durchaus auf die Bedingungen während der Kristallisation der jeweiligen Proteine zurückzuführen sein, oder aber tatsächlich auf die Proteinstrukturen selbst. So wurde sowohl anhand der Röntgenstruktur der *R. rubrum* - CODH als auch anhand von Untersuchungen zum Ni-Einbau und der Ni-Aktivierung ein Mechanismus zur Ni-Insertion formuliert (Abb. 1-8, A). Drei Sulfide des reduzierten $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ - Subclusters binden dabei Ni und bilden einen $\text{Ni}\cdot\text{CODH}$ -Komplex. Die Ni-Bindung scheint darüber hinaus redox-abhängig zu sein. Das Fe-Atom der FCII site erleichtert die Deprotonierung der Thiolgruppe des Cystein⁵³¹, welches schließlich das Ni bindet und den Cluster vervollständigt (Jeon et al. 2005). Da keine absolute Gewissheit über die katalytisch aktive Form des C-Clusters besteht, wurde ferner ein alternativer Mechanismus der Ni-Insertion formuliert (Abb. 1-8, B), welcher auf der C-Cluster-Struktur der CODH II aus *C. hydrogenoformans* basiert.

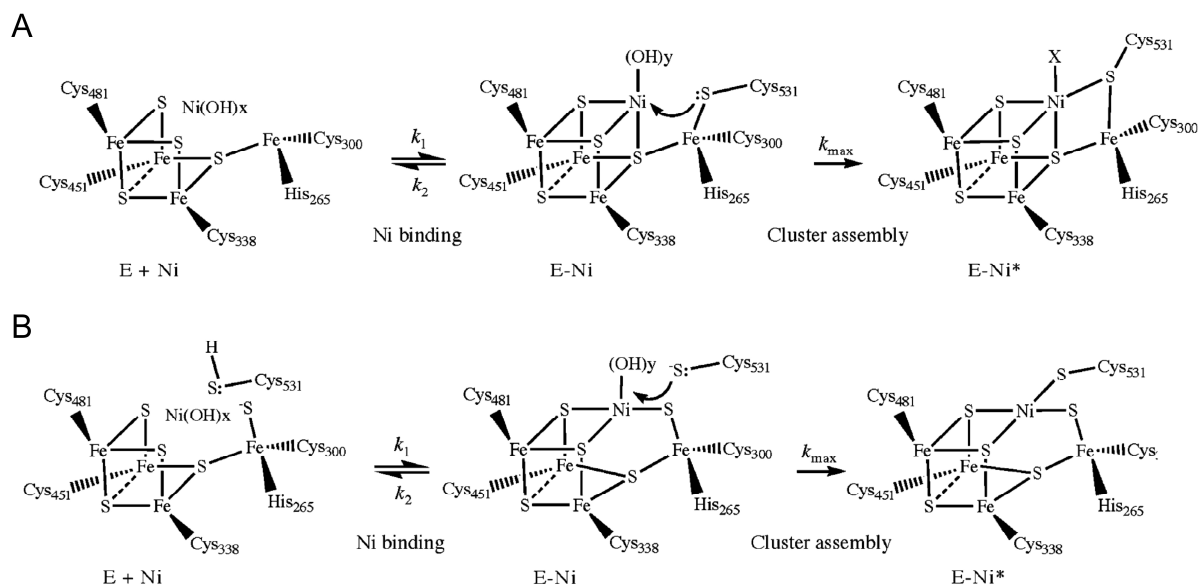


Abbildung 1-8: Modelle der Ni-Insertion in den C-Cluster der NiFe CO-Dehydrogenase (aus Jeon et al. 2005).

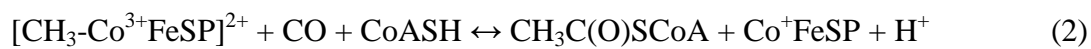
Mechanismus A beschreibt die Insertion des Ni basierend auf der Struktur des $[\text{NiFe}_4\text{S}_4]$ C-Clusters der CO-Dehydrogenase aus *R. rubrum*. Die Assemblierung ist angelehnt an die 2,8 Å - Kristallstruktur nach Drennan et al. (2001). Mechanismus B veranschaulicht die Assemblierung des C-Clusters ausgehend von der Struktur des C-Clusters der CODH II aus *C. hydrogenoformans* nach Dobbek et al. (2001).

Der wesentliche Unterschied zwischen beiden Strukturen ist das Vorhandensein des μ^2 -Sulfides, welches das Ni und die FCII site im C-Cluster der CODH II aus *C. hydrogenoformans* verbrückt, jedoch im C-Cluster der CODH aus *R. rubrum* fehlt. In diesem Mechanismus würde Ni sowohl an die beiden μ^2 -Sulfide des $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ - Subclusters binden, als auch an das terminale Sulfid, welches an der FCII site gebunden ist. Die irreversible Bindung des Thiolats des Cystein⁵³¹ würde den Cluster schließlich vervollständigen (Jeon et al. 2005).

Bifunktionale CO-Dehydrogenasen (ACS/CODHs) reduzieren CO_2 zu CO und katalysieren die Synthese von Acetyl-CoA (Doukov et al. 2002; Lindahl 2002). In den letzten Jahren wurden zahlreiche Kristallstrukturen der ACS/CODH aus *Moorella thermoacetica* gelöst. Der 310 kDa $\alpha_2\beta_2$ -heterotetramere Komplex (Abb. 1-9, A) katalysiert die Reduktion von CO_2 im C-Cluster der β -Untereinheiten (homolog zur homodimeren CO-Dehydrogenase aus z.B. *R. rubrum* oder *C. hydrogenoformans*) sowie die Synthese von Acetyl-CoA aus CO, CoA und

einer Methylgruppe in den ACS (α) - Untereinheiten. Ein „Tunnel“ (Abb. 1-9, B) verbindet die aktiven Zentren, so dass das am C-Cluster generierte CO selektiv in Acetyl-CoA am A-Cluster (Abb. 1-9, C) inkorporiert werden kann (Maynard und Lindahl 1999; Seravalli und Ragsdale 2000). Die für die Acetyl-CoA-Synthese notwendige Methylgruppe wird durch ein Corrinoid-Eisen-Schwefel-Protein (CoFeSP) zum A-Cluster transportiert (Doukov et al. 2002; Darnault et al. 2003).

Die Synthese von Acetyl-CoA am A-Cluster beinhaltet damit eine Methyl-Transfer-Reaktion, eine Carbonylierung sowie die Synthese einer energiereichen Thioester-Bindung (Lindahl 2002):



Das Corrinoid-Eisen-Schwefel-Protein (CoFeSP) ist als Heterodimer organisiert. Eine Untereinheit enthält dabei ein Cobalamin, die andere einen $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster (Ragsdale und Kumar 1996).

Der A-Cluster (vgl. Abb. 1-9, C) weist einen typischen $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster auf, welcher von vier Cystein-Resten koordiniert wird. Einer dieser Cystein-Liganden verbrückt den Eisen-Schwefel-Cluster mit einem binuklearen Cu/Ni-Zentrum (Doukov et al. 2002) und erinnert damit an die Struktur von Fe-Hydrogenasen. Letztere enthalten einen $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster, der über einen Cystein-Rest mit der binuklearen Fe site verbrückt ist (Peters et al. 1998; Nicolet et al. 1999). Das Cu-Ion ist über zwei Cystein-Seitenketten mit dem Ni verbunden. Zusätzlich wird Ni über zwei N-Atome des Protein-Rückgrates koordiniert (Doukov et al. 2002; Darnault et al. 2003).

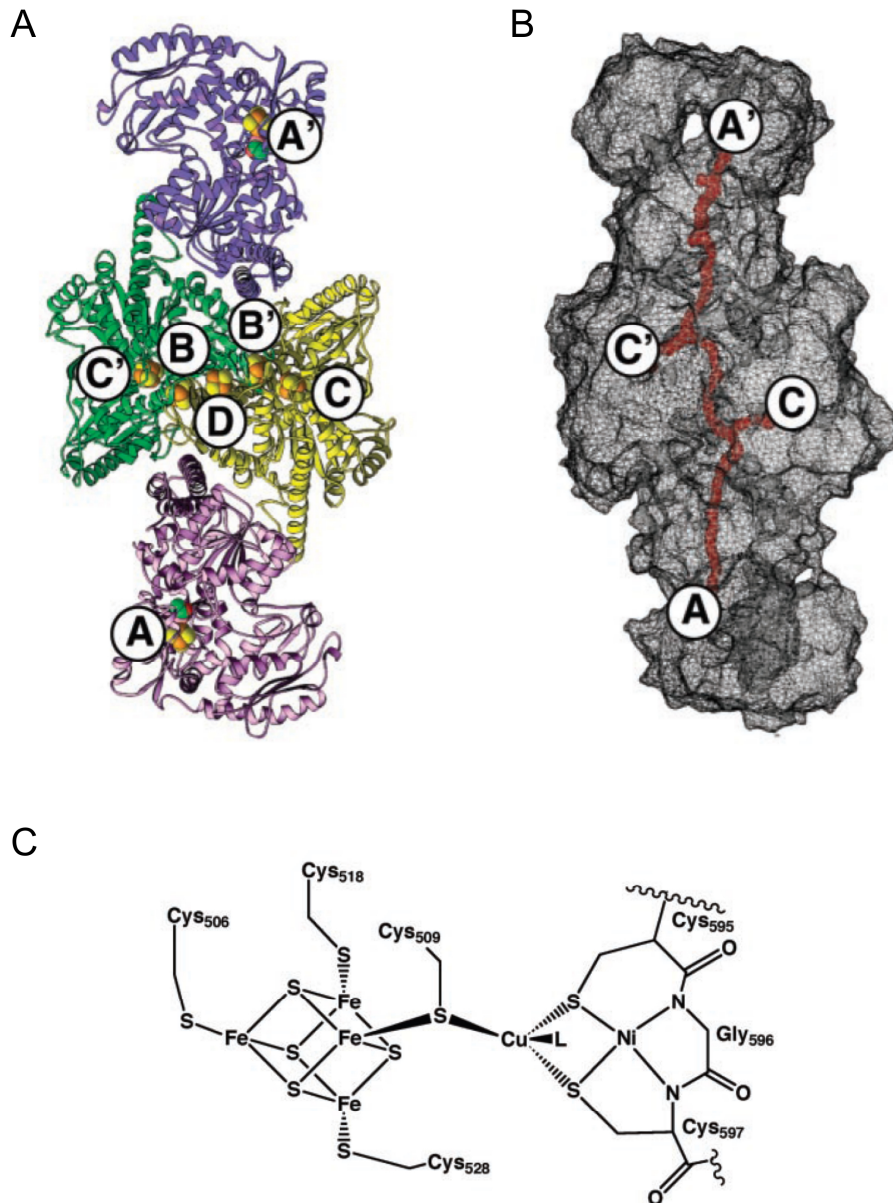


Abbildung 1-9: Struktur des ACS/CODH-Komplexes aus *M. thermoacetica* (nach Doukov et al. 2002).

(A) Kristallstruktur des ACS/CODH-Komplexes bei einer Auflösung von 2,2 Å. Die α-Domänen sind hell- und dunkelviolett dargestellt, die β-Domänen in grün und gelb. Für die Metallcluster A bzw. A' (in der ACS/α-Untereinheit) sowie B/B', C/C' und D (in den CODH-Untereinheiten) gilt folgendes Farbschema: S, gelb; Fe, orange; Cu, pink; Ni, blau; C, grün; N, blau; O, rot. Der Abstand zwischen den A- und C-Clustern beträgt ca. 67 Å.

(B) Mögliche Tunnel für CO, berechnet mithilfe des Programmes CAVENV. Die Orientierung des Komplexes entspricht derjenigen aus (A).

(C) Struktur des A-Clusters. L repräsentiert die Position eines noch unbekannten Liganden.

Während der Katalyse (Abb. 1-10) bindet das erzeugte CO an das Cu-Ion des A-Clusters (Maynard und Lindahl 1999; Seravalli und Ragsdale 2000; Doukov et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass unter hoher CO-Konzentration auch eine Bindung an das Ni-Ion möglich ist, so dass CO sowohl als Substrat als auch als Inhibitor fungieren könnte. Für den Methyl-Transfer zwischen dem Corrinoïd-Kofaktor und dem Ni-Ion wird zunächst eine „offene“ Corrinoïd-Konformation benötigt, welche durch „Gleiten“ der Domänen der α -Untereinheit erzeugt wird. Durch CO-Insertion und Methyl-Transfer wird schließlich eine metallgebundene Acetylgruppe geformt. Dieser Schritt dürfte sich in einer „geschlossenen“ Konformation vollziehen, in welcher der A-Cluster für das umgebende Solvenz unzugänglich ist (Maynard und Lindahl 1999; Seravalli und Ragsdale 2000). Nach Bildung des Acetyl-Intermediats wird erneut eine „offene“ Konformation angenommen, um den Zugang von CoA zu ermöglichen. Nach erfolgter Bindung wird HSCoA deprotoniert und schließlich acetyliert (Barondeau und Lindahl 1997; Doukov et al. 2002). Eine vorübergehende Interaktion von CoA und einem der beiden Metalle des A-Clusters könnte dabei diese Reaktion erleichtern. So könnte CoA in unmittelbarer Nähe des Cu binden, um so mit der Cu-gebundenen Acetyl-Spezies reagieren zu können (Doukov et al. 2002).

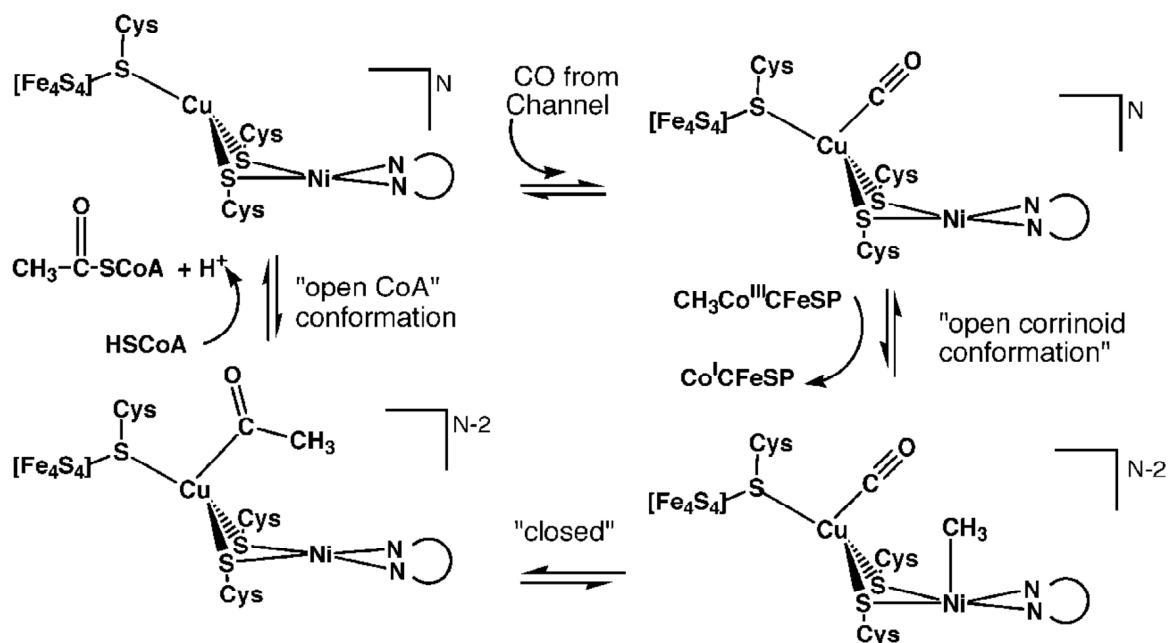


Abbildung 1-10: Vorgeschlagener Mechanismus der Acetyl-CoA-Synthase Reaktion (aus Doukov et al. 2002).

Dargestellt ist der mögliche Reaktionsmechanismus der Synthese von Acetyl-CoA am A-Cluster der Acetyl-CoA-Synthase. CO entsteht dabei durch Reduktion von CO₂ am C-Cluster und gelangt durch einen „Tunnel“ zum A-Cluster, wo es am Cu-Ion bindet. Das Ni-Ion könnte als Nukleophil die Methylgruppe des Protein-gebundenen Methylcob(III)amids angreifen, was in Cob(I)amid und einer methylierten Ni-Spezies resultiert (Menon und Ragsdale 1999). Die Reaktion von CO und der Methylgruppe könnte durch eine „Alkyl-Wanderung“ erfolgen, welche in einem Cu-gebundenen Acetyl-Intermediat resultiert. Schließlich wird HSCoA deprotoniert und acetyliert (Doukov et al. 2002).

1.5.2 Die CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans*

Bei der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* handelt es sich um ein molybdän- und kupferhaltiges Eisen-Schwefel-Flavoprotein. Es gehört zur Familie der Molybdän-Hydroxylasen, besitzt aber im Gegensatz zu mononuklearen Mo-Enzymen im aktiven Zentrum einen einzigartigen bimetalischen Cluster (Dobbek et al. 1999, 2002). Die CO-Dehydrogenase ermöglicht die Nutzung von CO im carboxidotrophen Stoffwechsel (Meyer et al. 1993a). Im Zuge der Charakterisierung dieses Schlüsselenzyms konnte ebenso Wasserstoff-Dehydrogenase-Aktivität nachgewiesen werden (Santiago und Meyer 1996). Abb. 1-11 zeigt die Struktur dieses Flavoproteins. Die CO-Dehydrogenase ist ein Dimer aus (LMS)-Heterotrimeren und besitzt eine Masse von 277 kDa. Die Gene *coxMSL* kodieren für die Untereinheiten L, M und S (Schübel et al. 1995; Santiago et al. 1999; Fuhrmann et al. 2003).

Die L-Untereinheit ist ein 88,7 kDa großes Molybdokupferprotein, kodiert von *coxL*. In dieser Untereinheit befindet sich das aktive Zentrum des Enzyms (Dobbek et al. 1999; Dobbek et al. 2002; Gnida et al. 2003). Am [CuSMoO₂]-Cluster wird das Kohlenmonoxid zu Kohlendioxid oxidiert. Der Molybdopterin-Cytosin-Dinukleotid (MCD)-Kofaktor koordiniert das Molybdänion im aktiven Zentrum (Johnson et al. 1990; Meyer et al. 1993a; Dobbek et al. 1999), das Kupferion wird vom Cystein³⁸⁸ des *active site loop* V³⁸⁴AYRCSFR³⁹¹ koordiniert (Schübel et al. 1995; Santiago et al. 1999).

Die M-Untereinheit beherbergt den Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)-Kofaktor. Die Bindung von FAD als prosthetische Gruppe an das 30,2 kDa große Flavoprotein erfordert dabei den heterotrimeren Enzymkomplex (Gremer et al. 2000; Dobbek et al. 2002).

Bei der S-Untereinheit handelt es sich um ein Eisen-Schwefel-Protein mit einer Masse von 17,8 kDa. Es besitzt einen [2Fe-2S]-Cluster proximal zum [CuSMoO₂]-Cluster und einen weiteren [2Fe-2S]-Cluster distal gelegen (Meyer et al. 1990). Acht der 22 Cysteine von CO-Dehydrogenase sind auf CoxS lokalisiert. Die Cysteine Cys⁴², Cys⁴⁷, Cys⁵⁰ und Cys⁶² bilden dabei ein C-X₄-C-X₂-C-X₁₁-C-Motiv, welches dem Bindemotiv anderer Eisen-Schwefel-Proteine entspricht (Schübel et al. 1995). In der kleinen Untereinheit CoxS, in Xanthin-Dehydrogenase und den Molybdän-abhängigen Regulatorproteinen (MOP) ist dieses Motiv sowie seine nähere Aminosäure-Umgebung konserviert.

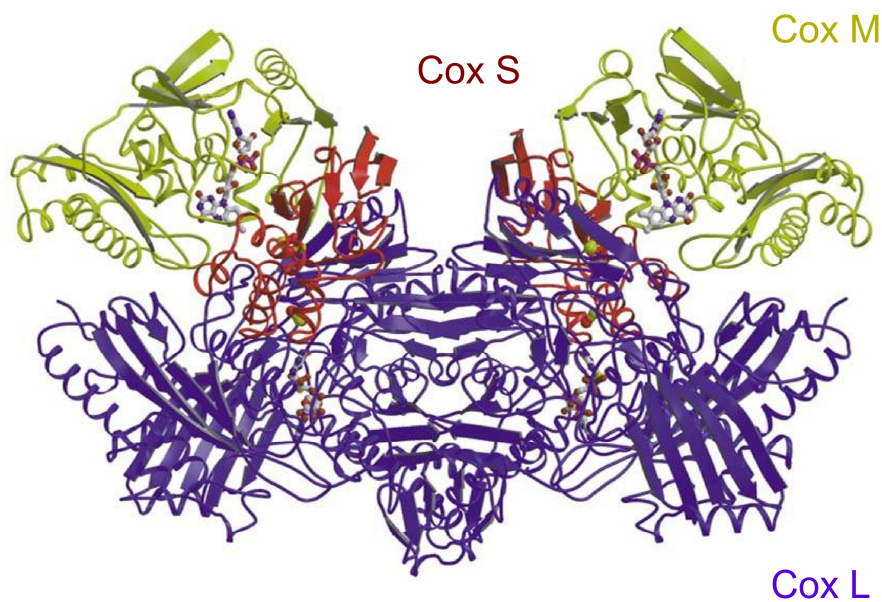


Abbildung 1-11: Kristallstruktur des CO-Dehydrogenase-Dimers aus *Oligotropha carboxidovorans* OM5 (Dobbek et al. 1999; Meyer et al. 2000).

Die CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* OM5 ist als Dimer zweier Heterotrimere organisiert. Jedes Dimer setzt sich aus einem Molybdo-Protein (CoxL, blau), einem Flavoprotein (CoxM, gelb) und einem Eisen-Schwefel-Protein zusammen (CoxS, rot) zusammen. Letzteres enthält die beiden [2Fe-2S]-Zentren, während das Molybdo-Protein CoxL den Molybdän-Molybdopterin-Cytosin-Dinukleotid (MCD)-Kofaktor enthält. CoxM trägt das FAD, welches am Ende der intramolekularen Transportkette steht. Die Kristallstruktur wurde bei einer Auflösung von 2,2 Å erstellt.

Die Kofaktoren der CO-Dehydrogenase ermöglichen einen intramolekularen Elektronentransport, bei dem die Elektronen, die bei der Oxidation von CO zu CO₂ erzeugt werden, vom [CuSMoO₂]-Cluster über den [2Fe-2S]_I und [2Fe-2S]_{II} Cluster auf das FAD

übertragen werden. Von dort werden die Elektronen zur Erzeugung eines Membranpotentials in die CO-insensitive Atmungskette eingespeist (Abb. 1-12) (Meyer et al. 1990).

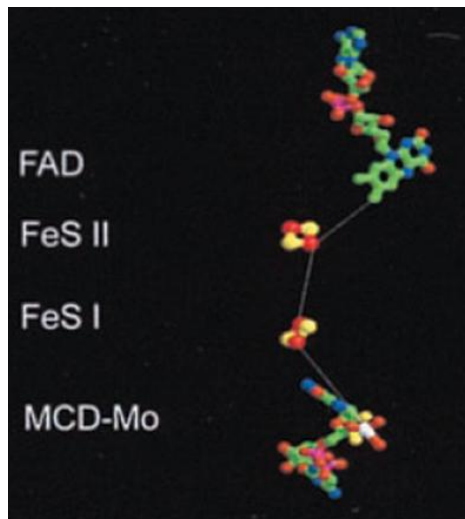


Abbildung 1-12: Intramolekularer Elektronen-transport der CO-Dehydrogenase (Dobbek et al. 1999).

Die bei der Oxidation von CO zu CO₂ frei werdenden Elektronen werden vom [CuSMoO₂]-Cluster (MCD-Mo) im aktiven Zentrum der CO-Dehydrogenase über die beiden Eisen-Schwefel-Cluster FeS I und FeS II auf das FAD übertragen. Anschließend erfolgt die Einspeisung in die CO-insensitive Atmungskette.

O. carboxidovorans OM5 synthetisiert neben der katalytisch aktiven Form der CO-Dehydrogenase mit einer Masse von 277 kDa verschiedene Apoenzyme, die Biosynthesestufen darstellen und nicht in der Lage sind, CO zu oxidieren (Gnida et al. 2003). Anders als das funktionale Enzym sind die Apoenzyme im aktiven Zentrum Kupfer- und/oder Schwefel-defizient, d. h. der Sulfanschwefel, der Molybdän und Kupfer verbrückt, ist nicht vorhanden (Gnida et al. 2003; Resch et al. 2005).

1.6 Das aktive Zentrum der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans*

Die L-Untereinheit der CO-Dehydrogenase beherbergt das aktive Zentrum des Enzyms, an dem sich die Oxidation von CO zu CO₂ vollzieht. Als Molybdo-Protein enthält CoxL das Molybdän, welches an zwei äquatorialen Positionen über das Endithiolat des Molybdopterin-Kofaktors koordiniert wird. Über einen Sulfido-Liganden, einen μ_2 -Brückenschwefel auf dem Niveau elementaren Schwefels (Sulfanschwefel), ist das Molybdän mit einem Cu(I)-Ion verbrückt, welches wiederum mit dem γ -Schwefel des Cysteins³⁸⁸ verbunden ist (Abb. 1-13). Das Cystein³⁸⁸ ist Bestandteil des *active site loops* V³⁸⁴AYRCSFR³⁹¹, welcher das Cu(I)-Ion im aktiven Zentrum der CO-Dehydrogenase positioniert (Dobbek et al. 2002). Neben *O. carboxidovorans* besitzen auch Organismen wie *Pseudomonas thermocarboxydovorans* (V³⁷⁸AYRCSFR³⁸⁵; Pearson et al. 1994), *Hydrogenophaga pseudoflava* (V³⁸¹AYRCSFR³⁸⁸;

Kang und Kim 1999) und *Mycobacterium tuberculosis* (V³⁷⁷AYRCSFR³⁸⁴; King 2003) eine Cu-Mo-CO-Dehydrogenase und vergleichbare *active site loops*.

Dobbek et al. (2002) modellierten die Struktur des aktiven Zentrums der CO-Dehydrogenase in oxidiertem Zustand bei einer Auflösung von 1,1 Å. Hiernach wird das dinukleare Zentrum aus einem Mo- und einem Cu-Ion aufgebaut, verbrückt durch den μ_2 -Schwefel. Die ursprüngliche Struktur nach Dobbek et al. (1999), welche mit einer Auflösung von 2,2 Å gelöst wurde und anstelle des Cu-Ions Selen enthielt, konnte somit korrigiert werden.

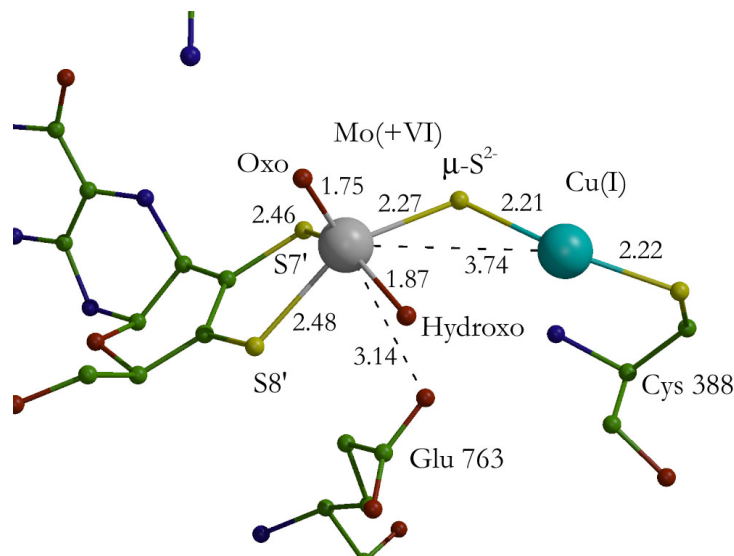


Abbildung 1-13: Das aktive Zentrum oxidiertierter CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* OM5 als Röntgenstruktur mit einer Auflösung von 1,1 Å (Dobbek et al. 2002).

Das Molybdoprotein CoxL der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* OM5 beherbergt das aktive Zentrum des Enzyms. Es handelt sich dabei um ein dinukleares Zentrum, welches ein Mo-Ion sowie ein Cu-Ion enthält. Beide Metallionen sind über einen μ_2 -Brückenschwefel miteinander verbunden, der den Sulfido-Liganden des Mo darstellt. Das Mo besitzt zusätzlich an apikaler und äquatorialer Position einen Oxo- bzw. Hydroxo-Liganden und wird durch die Endithiolatgruppe des Molybdopterin-Kofaktors koordiniert. Das Cu(I)-Ion ist mit dem γ -Schwefel des Cysteins³⁸⁸ verbunden, welches Teil des *active site loops* V³⁸⁴AYRCSFR³⁹¹ ist.

Die Assemblierung des [CuSMoO₂]-Clusters im aktiven Zentrum erfolgt posttranslational. Die Genprodukte des Subclusters *coxDEFG* auf dem Megaplasmid pHCG3 scheinen in diesem Zusammenhang funktionell zu sein (Santiago et al. 1999; Fuhrmann et al. 2003; Gnida et al. 2003). Das aktive Zentrum scheint dabei schrittweise aufgebaut zu werden, so dass als Biosynthese-Vorstufen ein [MoO₃]- und ein [MoO₂S]-Zentrum genannt werden können

(Resch et al. 2005). Dobbek et al. (2002) konnten zeigen, dass sich $[\text{MoO}_3]$ -Zentren durch Behandlung des Enzyms mit Kaliumcyanid herstellen lassen. Somit ließe sich auf diesem Wege eine vermeintliche Biosynthese-Vorstufe chemisch herbeiführen. Die Zugabe von Kaliumcyanid führt zur Freisetzung des Sulfanschweifels in Form von SCN^- sowie auch des Kupfers in Form von CuCN . Die resultierende Enzymspezies ist inaktiv, kann aber durch Zugabe von Na_2S unter Dithionit-reduzierenden Bedingungen zu $[\text{MoO}_2\text{S}]$ und dieses durch Zugabe von Cu(I) unter anoxischen Bedingungen zum vollständigen $[\text{CuSMoO}_2]$ -Cluster wieder aufgebaut werden (vgl. Kap. 1.7).

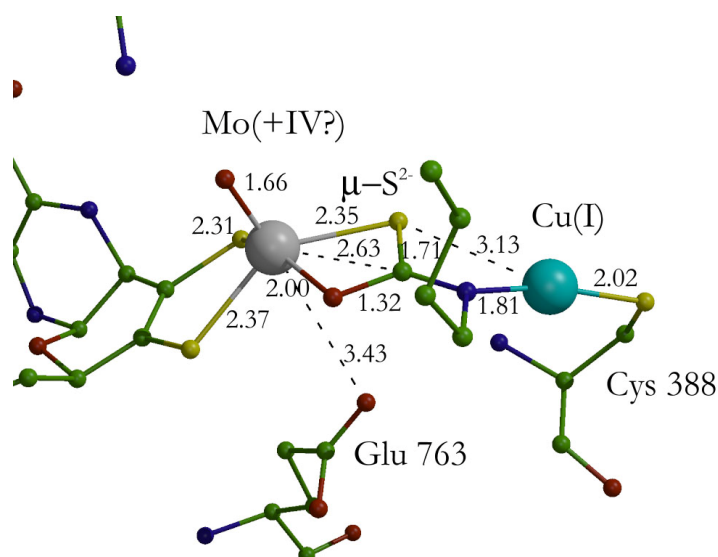


Abbildung 1-14: Das aktive Zentrum der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* OM5 als Röntgenstruktur nach Inhibierung mit nBIC (Dobbek et al. 2002).

Durch die Behandlung von CO-Dehydrogenase mit n-Butyl-Isocyanid (nBIC) kommt es zur Ausbildung eines Thiocarbamats zwischen dem Molybdän- und dem Kupfer-Ion. Die Isocyanid-Gruppe bindet mit dem Kohlenstoffatom an den μ_2 -Brückenschwefel sowie die Hydroxy-Gruppe des Molybdäns, das Stickstoff-Atom bildet eine Bindung zum Kupfer-Ion aus. nBIC führt dadurch zur Inaktivierung des Enzyms.

Ein möglicher Reaktionsmechanismus der Oxidation von CO zu CO_2 wurde durch Röntgenkristallographie inhibierter CO-Dehydrogenase postuliert. n-Butyl-Isocyanid (nBIC) wirkt als Substratanalogon, kann im Gegensatz zu CO allerdings nicht umgesetzt werden und bindet irreversibel an das aktive Zentrum der CO-Dehydrogenase. Es besitzt im Vergleich zu CO ähnliche σ -Donor- und π -Akzeptor-Ligandeneigenschaften und ein nicht-bindendes Elektronenpaar im sp -hybridisierten Orbital des terminalen Kohlenstoffs. nBIC kann CO-

Dehydrogenase nur im oxidierten Zustand inhibieren, nicht aber im reduzierten. Die Bindung von nBIC führt zur Bildung eines Thiocarbamats: Die Isonitril-Gruppe bindet mit ihrem Kohlenstoff-Atom an den Molybdän-Schwefel und die Hydroxo-Gruppe des Mo, das Stickstoffatom bindet an das Cu(I)-Ion (Abb. 1-14). Im Zuge der Bildung des Thiocarbamat-Derivates wird das Mo^{VI} zu Mo^{IV} reduziert, der Abstand von Cu und Mo vergrößert sich von 3,74 Å auf 5,07 Å (Dobbek et al. 2002).

Dobbek et al. (2002) formulierten unter der Annahme, dass CO analog zu nBIC im aktiven Zentrum bindet, einen Reaktionsmechanismus für die Oxidation von CO (Abb. 1-15). Die Bindung von CO würde demnach im oxidierten Zustand zwischen dem Cu-Ion und dem Sulfido- und Hydroxo-Liganden des Mo erfolgen, was zur Ausbildung eines Thiocarbonats als Intermediärzustand führt. Das Molybdän wird dabei von der Oxidationsstufe +VI auf +IV reduziert. Schließlich wird CO_2 abgespalten und die äquatoriale Hydroxo-Gruppe am Molybdän durch Wasser regeneriert. Die Reoxidation des Molybdäns erfolgt durch den Transfer von Elektronen über den Eisen-Schwefel-Cluster FeS I in die intramolekulare Elektronentransportkette.

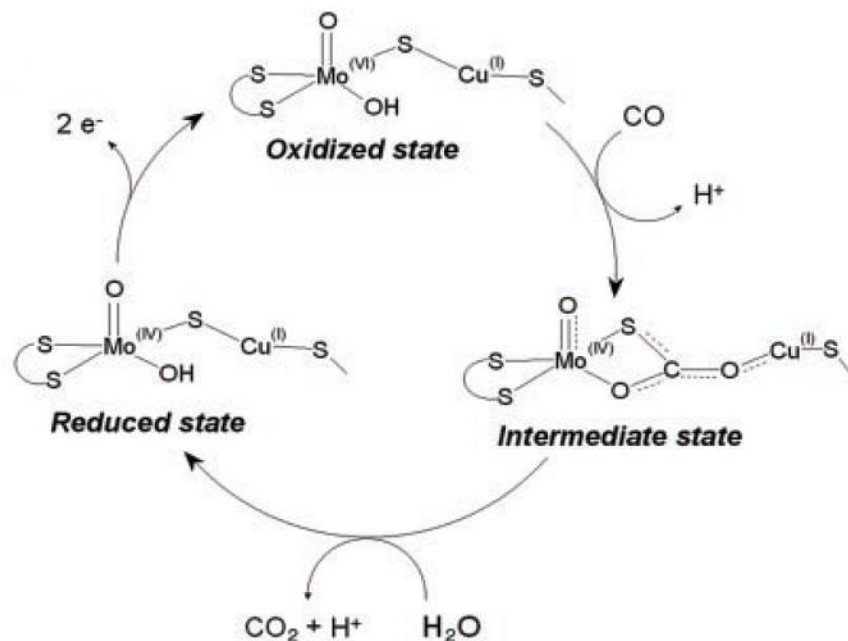


Abbildung 1-15: Hypothetischer Reaktionsmechanismus der Oxidation von CO im aktiven Zentrum von CO-Dehydrogenase nach Dobbek et al. (2002).

Das Modell der Oxidation von CO zu CO₂ nach Dobbek et al. (2002) geht vom aktiven Zentrum der CO-Dehydrogenase im oxidierten Zustand (Mo^{+VI}) aus. Durch die Bindung von CO zwischen dem Sulfido- und Hydroxo-Liganden des Mo und dem Cu(I)-Ion entsteht im aktiven Zentrum in Analogie zur Bindung von nBIC, ein Thiocarbonat als Intermediärzustand. Das Mo wird zur Oxidationsstufe +IV reduziert. Schließlich wird CO₂ abgespalten und die äquatoriale Hydroxo-Gruppe des Mo durch Wasser ersetzt. Auf diese Weise wird das aktive Zentrum im reduzierten Zustand wiederhergestellt. Durch den Transfer von Elektronen über den Eisen-Schwefel-Cluster FeS I in die intramolekulare Elektronentransportkette wird Mo reoxidiert und der Reaktionszyklus geschlossen.

Auf Basis der Röntgenstruktur der Mo/Cu - CO-Dehydrogenase (vgl. Abb. 1-13) wurden in jüngster Zeit quantenmechanische Berechnungen hinsichtlich des Mechanismus der CO-Oxidation durchgeführt (Hofmann et al. 2005; Siegbahn und Shestakov 2005). Mögliche Intermediate der Reaktion wurden unter Anwendung verschiedener Hybrid - DFT -Techniken untersucht, als auch die Energie-Barrieren zwischen den Zuständen. In die Betrachtungen wurden zudem auch die Ladungszustände mit-einbezogen, da z.B. für Sulfit-Oxidase (aus Hühnerleber) ein direkter Zusammenhang zwischen der Protonen-Anzahl im aktiven Zentrum und dem pH-Wert ermittelt werden konnte (Astashkin et al. 2000). Diese (computergestützten) Analysen ergaben im Gegensatz zu dem von Dobbek et al. (2002) postulierten Reaktionsmechanismus (Abb. 1-15), dass es aus thermodynamischer Sicht keine signifikante, treibende Kraft für die Bildung eines Thiocarbonats im aktiven Zentrum gibt. Eine solche Spezies würde zudem den Abstand der beiden Metallzentren enorm vergrößern.

Der von Hofmann et al. (2005) und Siegbahn und Shestakov (2005) postulierte katalytische Zyklus der CO-Oxidation (Abb. 1-16) geht von einem [CuSMoO₂]-Cluster in der bisoxo-Form (1) aus. Letztere kann dadurch erzeugt werden, dass das Glu⁷⁶³ zunächst ein Proton verliert, im Anschluss allerdings das Proton der Hydroxo-Gruppe des Mo übernimmt. Die Bindung von CO (2) erfolgt an der aus energetischer Sicht günstigsten Position, am Cu-Ion. Der Abstand Cu-CO beträgt dabei nur 1,95 Å. Im weiteren Verlauf des Reaktionszyklus verringert sich die C-O - Distanz auf 1,40 Å, während sich der Mo-O - Abstand auf 2,03 Å vergrößert. Der Angriff der Oxo-Gruppe führt schließlich (in einer exothermischen Reaktion) zur Bildung eines zyklischen Intermediats (3), welches nach Hofmann et al. (2005) durch Isomerisierung in einen thermodynamisch günstigeren 4-Ring (4) übergeht. Eine weitere Isomerisierung zum postulierten Thiocarbonat (5) hätte thermodynamisch gesehen nur eine äußerst geringe Triebkraft. Die CO₂-Spezies wird schließlich durch ein H₂O-Molekül ersetzt.

Dieser Vorgang könnte dabei über ein weiteres Intermediat (6) erfolgen, welches aus energetischer Sicht ein Minimum darstellt. Nach Freisetzung des CO_2 liegt das Mo-Zentrum zunächst als 4fach-koordiniertes Mo(IV) (7) vor, ehe der Hydroxo-Ligand ersetzt wird (8). Der Reaktionsmechanismus schließt sich durch Reoxidation des aktiven Zentrums, welches sodann in der bisoxo-Form (1) vorliegt (Hofmann et al. 2005; Siegbahn und Shestakov 2005).

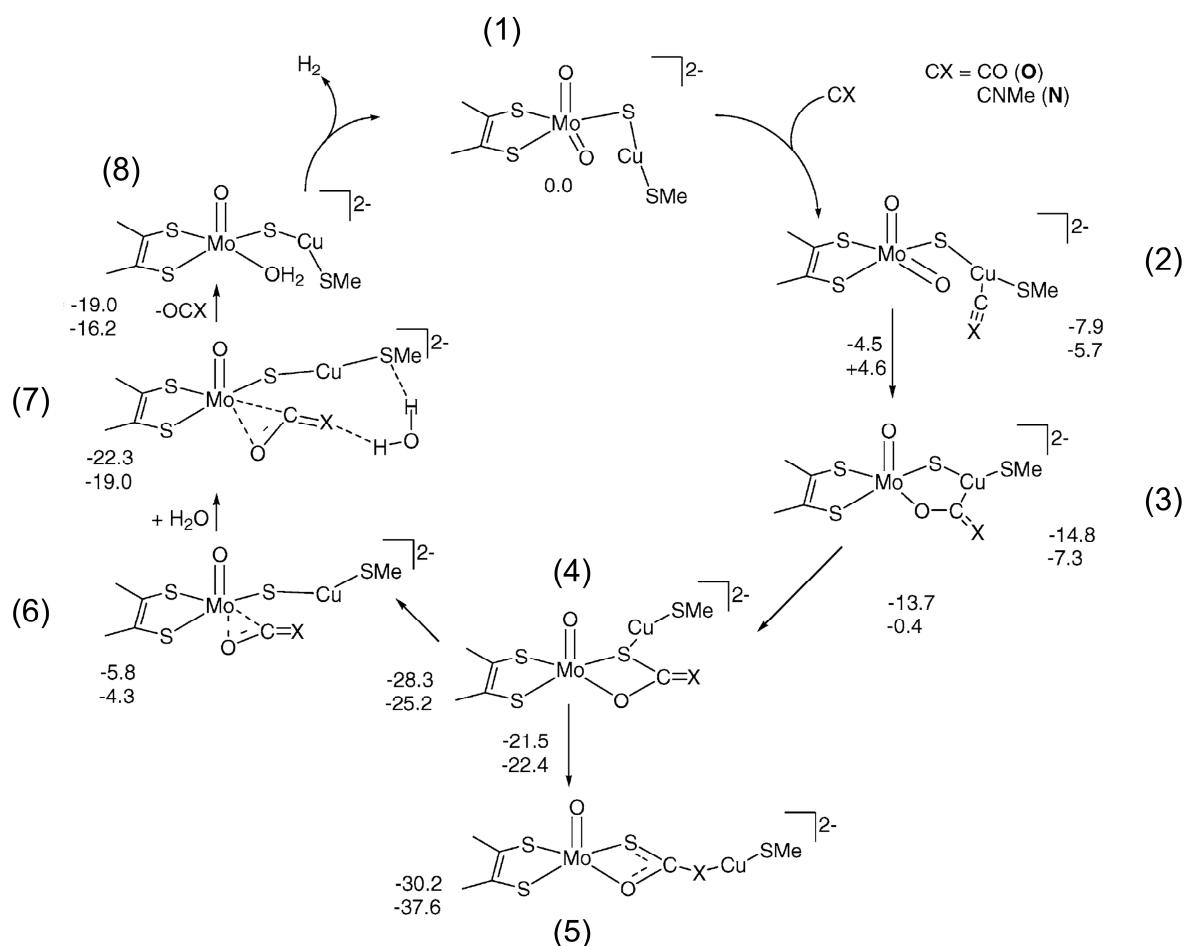


Abbildung 1-16: Modifizierter Reaktionszyklus für die Oxidation von CO und MeNC (verändert nach Hofmann et al. 2005).

Ausgehend von quantenmechanischen Betrachtungen wurde von Hofmann et al. (2005) als auch von Siegbahn und Shestakov (2005) ein Reaktionsmechanismus für die Oxidation von CO postuliert, der davon ausgeht, dass CO an der energetisch günstigsten Position, am Cu-Ion bindet (2). Der Angriff der Oxo-Gruppe führt zunächst zur Bildung einer 5-Ringes (3), welches schließlich durch Isomerisierung in einen thermodynamisch günstigeren 4-Ring (4) übergeht. Hiervon ausgehend wäre eine weitere Isomerisierung zum bereits postulierten Thiocarbonat (5) möglich. Diese Reaktion hätte thermodynamisch gesehen allerdings nur eine äußerst geringe Triebkraft. Die in Intermediat (4) gebundene CO_2 -Spezies wird schließlich über zwei weitere mögliche Intermediate (6, 7) durch H_2O ersetzt. Damit liegt das aktive Zentrum in reduzierter Form vor (8), welches zur bisoxo-Form (1) wieder reoxidiert werden kann. Die relativen Energie-Werte ΔE der verschiedenen Intermediate sind in Kilokalorien pro Mol angegeben (Hofmann et al. 2005; Siegbahn und Shestakov 2005).

Genauere energetische Betrachtungen des von Dobbek et al. (2002) postulierten Thiocarbonats ergaben, dass es sich bei letzterem um ein sehr stabiles Intermediat handelt, welches u. U. zum Abbruch des katalytischen Zyklus führen könnte. Thermodynamisch gesehen stellt das von nBIC ausgehende Thiocarbamat eine sogar noch noch stabilere Struktur dar, was sich experimentell im inhibitorischen Effekt von nBIC verdeutlichte. Siegbahn und Shestakov (2005) führten hierzu weitere computergestützte Analysen durch. Diese führten zu einer Ergänzung bzw. Modifizierung des in Abb. 1-16 postulierten Modells (siehe Abb. 1-17). Der 4-Ring (Abb. 1-16, 4 bzw. Abb. 1-17, 2), welcher bereits eine SCO_2 -Struktur aufweist, geht hiernach in ein weiteres SCO_2 -Intermediat über (Abb. 1-17, 3), welches das bereits von Dobbek et al. (2002) postulierte Thiocarbonat darstellt. Die Insertion von Wasser zwischen Mo und der SCO_2 -Gruppe führt zur Spaltung der S-C - Bindung (4), die Freisetzung von CO_2 zu einem weiteren energetischen Minimum (5). Die Abgabe von zwei Elektronen und einem Proton führt das aktive Zentrum schließlich in seine bisoxo-Form zurück (vgl. Abb. 1-16, 1).

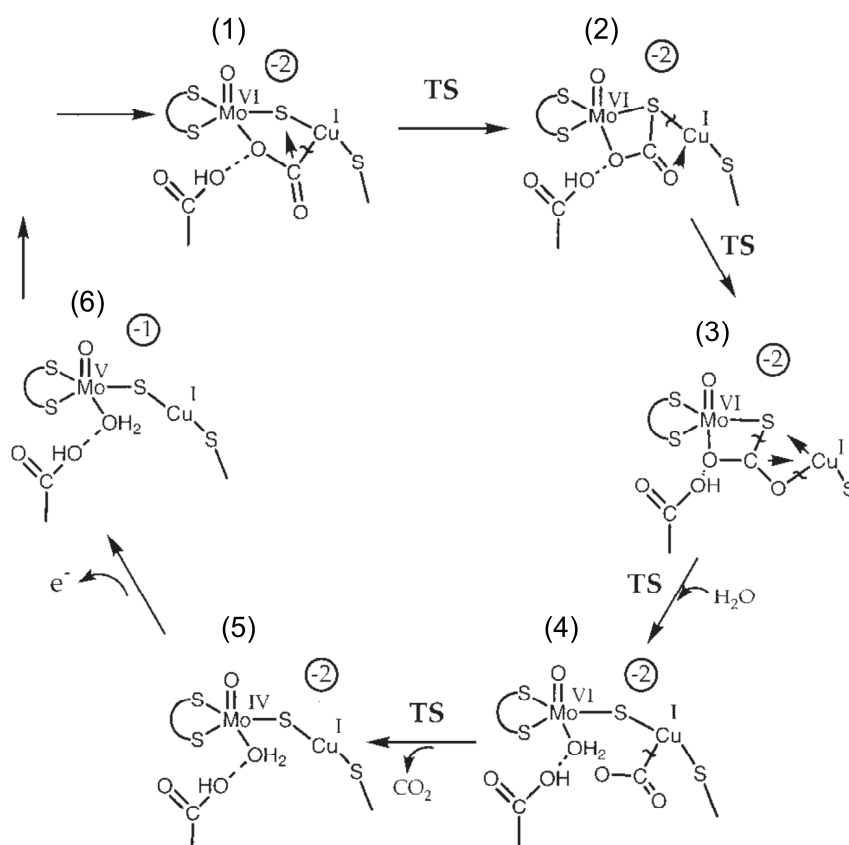


Abbildung 1-17: Modifizierter katalytischer Zyklus der CO-Oxidation unter Berücksichtigung der Bildung von S-C - Bindungen (verändert nach Siegbahn und Shestakov 2005).

Nach Siegbahn und Shestakov (2005) entsteht aus dem gebildeten 5-Ring (1) eine erste SCO_2 -Struktur (2), welche durch Isomerisierung in das von Dobbek et al. (2002) postulierte Thiocarbonat (3) übergeht. Im Zuge der Insertion von H_2O kommt es schließlich zur Spaltung der S-C - Bindung (4) und zur Freisetzung von CO_2 (5). Die bisoxo-Form des aktiven Zentrums wird schließlich durch Abgabe von zwei Elektronen und einem Proton erreicht (Siegbahn und Shestakov 2005).

^{13}C und $^{63,65}\text{Cu}$ ENDOR-Studien unterstützen die in Abb. 1-16 und Abb. 1-17 dargestellten Reaktionsmechanismen. Analysen wurden während der CO-Reduktion des Enzyms mit einem $S = 1/2$ Intermediat durchgeführt. Der Vergleich mit entsprechenden Mo(V) - Spezies von Xanthin-Oxidase führte zu dem Schluss, dass ein teilweise reduziertes Mo(V)/Cu(I) -Zentrum während der Reduktion gebildet wurde. Dabei handelt es sich um ein Cu-Carbonyl-Intermediat (Shanmugam et al. 2013). Im weiteren Verlauf des Reaktionszyklus kommt es schließlich zum nukleophilen Angriff des äquatorialen M=O Sauerstoffs. Die teilweise Aktivierung des Cu-gebundenen CO führt im Anschluss zu drei weiteren Spezies (Abb. 1-16; 3, 4 und 6). Die formale Reduktion des binuklearen Clusters, die Bildung und Freisetzung von CO_2 sowie die Regeneration des äquatorialen Mo-Liganden schließen den Reaktionszyklus (Hofmann et al. 2005; Shanmugam et al. 2013).

1.7 Chemische Rekonstitution des aktiven Zentrums der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans*

Den Genprodukten des Subclusters *coxDEFG* wird eine zentrale Rolle bei der posttranslationalen Reifung des $[\text{CuSMoO}_2]$ - Clusters im aktiven Zentrum der CO-Dehydrogenase zugeschrieben (Santiago et al. 1999; Fuhrmann et al. 2003; Gnida et al. 2003). Von CoxD ist darüber hinaus bekannt, dass es eine Funktion bei der Inkorporation des cyanolysierbaren Schwefels in den Cluster besitzt (Pelzmann et al. 2009; Maisel et al. 2012). Da solche akzessorischen Proteine als Enzyme Reaktionen beschleunigen, wurde bereits untersucht, ob sich der Metallcluster von CO-Dehydrogenase auch direkt chemisch aufbauen lässt (Resch et al. 2005).

Zudem zeigt sich, dass aufgereinigte Präparate von CO-Dehydrogenase sich durchaus im Gehalt an cyanolysierbarem Schwefel, Kupfer und auch in der CO-oxidierenden Aktivität

unterscheiden. Die höchste gemessene Aktivität eines Präparates betrug 23,16 U/mg (Gnida et al. 2003), jedoch liegt die üblicherweise erhaltene Aktivität meist niedriger. Somit ist davon auszugehen, dass neben vollständig assemblierter, aktiver Enzym-Spezies auch Biosynthese-Vorstufen in aufgereinigten Präparaten vorhanden sein dürften, deren aktive Zentren in unterschiedlichem Maße sulfuriert und cupruiert vorliegen.

Nach Gnida et al. (2003) kommt es nach der Translation der CO-Dehydrogenase-Strukturgene *coxL*, *coxM* und *coxS* und der Assemblierung der Genprodukte zur (LMS)₂-Untereinheitenstruktur zunächst zum Einbau des Molybdän-Kofaktors und des FAD. Danach wird (posttranslational) der Metallcluster im aktiven Zentrum stufenweise aufgebaut, ausgehend von einem [MoO₃]-Ion. Diese Desulfo-Form wird zunächst zu einer weiter Cu-defizienten Form, [MoO₂S], modifiziert. Der letzte Schritt zum aktiven Enzym stellt im Anschluss die Inkorporation des Cu(I) dar (Gnida et al. 2003).

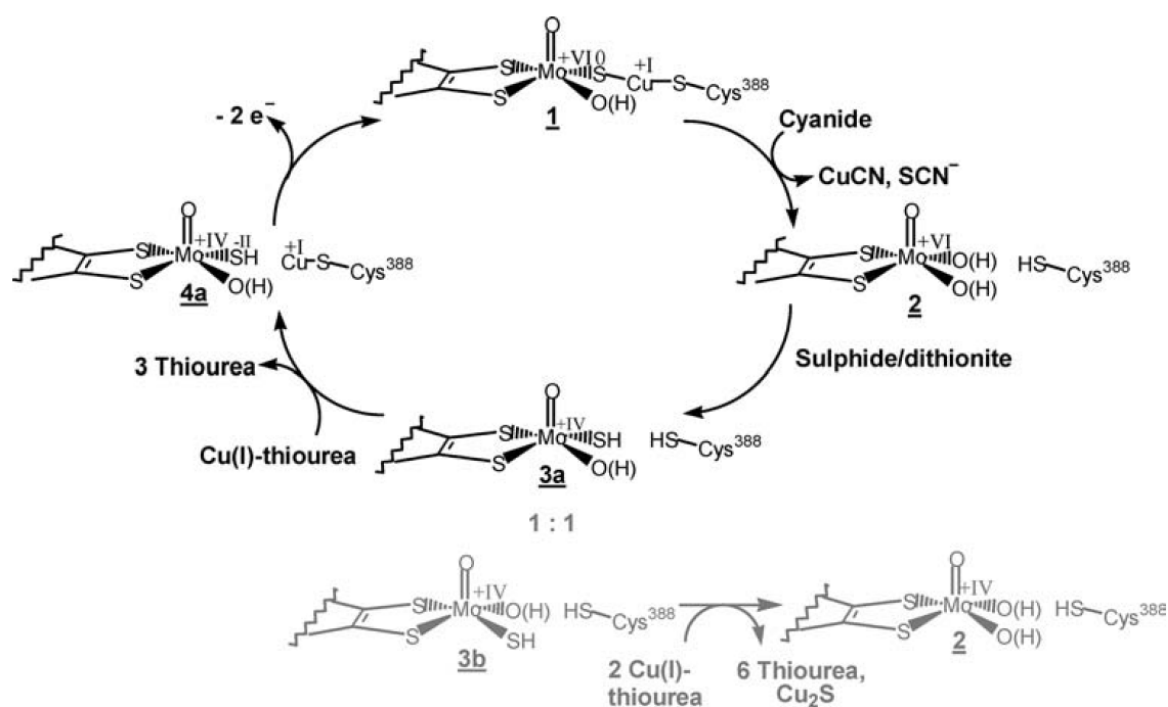


Abbildung 1-18: Mechanismus der chemischen Rekonstitution des aktiven Zentrums von CO-Dehydrogenase (aus Resch et al. 2005).

Das dargestellte hypothetische Modell beschreibt die chemische Rekonstitution des aktiven Zentrums ausgehend vom [CuSMoO₂]-Cluster eines funktionellen, aktiven Enzyms (1). Durch die Zugabe von Kaliumcyanid werden zunächst der Sulfanschwefel sowie Kupfer (I) in Form von CuCN und SCN⁻ freigesetzt, was zur Bildung eines [MoO₃] führt (2). Die anschließende Behandlung mit Natriumsulfid in Gegenwart von Na-Dithionit inkorporiert Schwefel. Diese Sulfurierung am Molybdän kann allerdings gleichermaßen im Verhältnis 1:1 an beiden äquatorialen Positionen ablaufen, wobei nur jeweils eine Position mit Schwefel besetzt wird (3a und 3b). Durch die Zugabe von Kupfer-Thioharnstoff-Komplex lässt sich die

Sulfido-Form 3a zu einem funktionellen $[\text{CuSMoO}_2]$ -Cluster rekonstituieren (4a bzw. 1), während die Sulfido-Form 3b durch Abspaltung des äquatorialen Schwefels in Form von Cu_2S zu einem $[\text{MoO}_3]$ zurück reagiert (2).

Resch et al. (2005) formulierten einen Mechanismus, nach dem sich inaktive CO-Dehydrogenase Spezies, die Biosynthese-Vorstufen (Apo-Enzyme) darstellen, zu aktiven Präparaten rekonstituieren lassen (Abb. 1-18). Demnach kann das aktive Zentrum eines (aktiven) Präparates von CO-Dehydrogenase (Abb. 1-18, 1) zunächst durch die Inkubation mit Kaliumcyanid in ein kupfer- und schwefeldefizientes System, ein $[\text{MoO}_3]$ (Abb. 1-18, 2) überführt werden. Das cyanolysierbare Kupfer sowie der Schwefel werden dabei in Form von CuCN bzw. SCN^- freigesetzt. Unter reduzierenden Bedingungen in Gegenwart von Dithionit kann durch die Zugabe von Natriumsulfid der Sulfido-Ligand des Molybdäns inkorporiert werden. Dabei können nach Resch et al. (2005) beide äquatoriale Positionen am Molybdän gleichermaßen sulfuriert werden (Abb. 1-18, 3a und 3b). Es kann davon ausgegangen werden, dass die Sulfurierung an diesen Positionen im Verhältnis 1:1 erfolgt, allerdings führt aufgrund der räumlichen Nähe zum γ -Schwefel des Cysteins³⁸⁸ nur eine Position nach Behandlung mit Kupfer-Thioharnstoff-Komplex zur Ausbildung des $[\text{CuSMoO}_2]$ - Clusters. Kupfer wird dabei zunächst vom γ -Schwefel des Cysteins gebunden (Abb. 1-18, 4a) und im Anschluss mit dem Sulfido-Liganden des Molybdän verbrückt. Wird der Schwefel an der anderen äquatorialen Position inkorporiert, so führt die nachfolgende Behandlung mit dem Kupfer-Thioharnstoff-Komplex zur Abspaltung des Schwefels in Form von Kupfer(II)-Sulfid (Cu_2S) und damit zur Bildung einer $[\text{MoO}_3]$ -Spezies (Abb. 1-18, 2). Das Modell erklärt somit, warum bei der chemischen Rekonstitution nur 50 % der ursprünglichen Aktivität erhalten werden können. Biosynthese-Vorstufen, die anstelle des vollständig assemblierten Metallclusters ein $[\text{MoO}_3]$ oder $[\text{MoO}_2\text{S}]$ enthalten, ließen sich auf diese Art zumindest teilweise zu einer aktiven Form rekonstituieren.

Basierend auf dem von Resch et al. (2005) formulierten Mechanismus der Rekonstitution waren Wilcoxon et al. (2011a) in der Lage, Präparate von CO-Dehydrogenase mit Silber zu rekonstituieren. Nach Sulfurierung einer $[\text{MoO}_3]$ -Spezies mit Sulfid und Dithionit wurde analog zur Cu-Rekonstitution (vgl. Kap. 2.29) ein Ag(I) -Thioharnstoff-Komplex zum anaeroben Enzym gegeben. Hierbei zeigte sich, dass der bimetallische Cluster auch durch Ag vervollständigt werden kann. Die Ag-Rekonstitution führte zu 30 % funktionellem Enzym, welches sich mit CO reduzieren ließ und eine signifikante, katalytische Aktivität aufwies.

Kinetische Studien zeigten allerdings, dass die erhaltenen Konstanten mit $k_{cat} = 8,2 \text{ s}^{-1}$ und $K_m = 2,95 \text{ }\mu\text{M}$ ($k_{cat} / K_m = 2,78 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) unter denen des nativen Enzyms lagen (Wilcoxon et al. 2011a).

1.8 Der Subcluster *coxDEFG* und dessen Genprodukte

54 Nukleotide stromabwärts der Strukturgene der CO-Dehydrogenase (*coxMSL*) findet sich der Subcluster *coxDEFG*. Dieser Subcluster ist Teil des CO-Stimulons und wird dementsprechend auch nur in Gegenwart von CO exprimiert (Santiago et al. 1999). Insbesondere den Genprodukten von *coxD*, *coxE* und *coxF* wird eine entscheidende Rolle bei der posttranslationalen Reifung des $[\text{CuSMoO}_2]$ -Clusters der CO-Dehydrogenase zugeschrieben (Fuhrmann et al. 2003).

Das *coxD*-Leseraster umfasst 888 Nukleotide, das entsprechende Proteinprodukt CoxD 295 Aminosäuren bei einer molekularen Masse von 33,367 kDa (Schübel et al. 1995; Santiago et al. 1999; Pelzmann et al. 2009; Maisel et al. 2012). Das Protein konnte als AAA+-ATPase Chaperon identifiziert werden und zeigt ausgeprägte Sequenz-Homologien zur BchI-Untereinheit von Mg^{2+} -Chelatase. In Anlehnung an BchI konnte so ein Homologie-basiertes Modell von CoxD erstellt werden (Maisel et al. 2012). Maisel et al. waren darüber hinaus in der Lage, in *E. coli* rekombinantes CoxD in Einschlusskörpern zu produzieren, letztere zu solubilisieren und das Protein rückzufalten. Es konnte gezeigt werden, dass das rekombinante Protein die vorhergesagte ATP-hydrolysierende Aktivität besitzt und MgATP in einem molaren Verhältnis von 1:1:1 in MgADP und Phosphat spalten kann. Auf dieser Grundlage kann CoxD eine Funktion als ATP-abhängiges Chaperon bei der posttranslationalen Reifung des aktiven Zentrums von CO-Dehydrogenase zugeschrieben werden (Maisel et al. 2012). Zudem ist die ATP-hydrolysierende Aktivität auch vom oligomeren Zustand des CoxD-Proteins abhängig. So konnten Maisel et al. (2012) CoxD-Dimere, -Tetramere und -Hexamere detektieren, wobei nur dimere und hexamere Strukturen über ATPase-Aktivität verfügten. Die Tatsache, dass in der *coxD*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 nahezu kein cyanolysierbarer Schwefel nachgewiesen werden konnte und ein $[\text{MoO}_3]$ -Ion im aktiven Zentrum vorliegt (Pelzmann et al. 2009), lässt darauf schließen, dass CoxD eine maßgebliche Funktion bei der Insertion des Schwefels in das aktive Zentrum besitzt. Jener ist in der *coxE*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 vollständig vorhanden, allerdings fehlt wie auch in der *coxD*-Mutante das Cu^+ (Gnida et al.

2003). Im Zuge der Reifung des aktiven Zentrums wären für das CoxD-Protein zwei Reaktionen denkbar: Die Chaperon-Funktion könnte die Konformation von apo-CO-Dehydrogenase dahingehend ändern, dass die Reifungsprozesse am aktiven Zentrum, welches 17 Å unterhalb der Oberfläche liegt und nur durch einen Substratkanal erreichbar ist (Dobbek et al. 1999), stattfinden können bzw. das aktive Zentrum für die „Reifungsmaschinerie“ zugänglich wird. Zum anderen könnte die Chaperon-Funktion eine tragende Rolle bei der direkten Insertion des cyanolysierbaren Schwefels spielen, indem an einer kurzen Peptid-Kette Cystein-Persulfide vom CoxD-Hexamer präsentiert werden und der Schwefel über diese Peptid-Kette dem aktiven Zentrum „dargeboten“ wird (Maisel et al. 2012). Untersuchungen der subzellulären Lokalisierung mit spezifischen Anti-CoxD-Immunoglobulin G Antikörpern ergaben, dass CoxD entgegen der Vorhersage als lösliches Protein und dem Fehlen eines Membran-Ankers nicht im Cytoplasma sondern in der Membranfraktion von *O. carboxidovorans* lokalisiert ist (Wengert 1997; Pelzmann et al. 2009; Maisel et al. 2012).

CoxE hat mit 399 Aminosäuren eine molekulare Masse von 44,2 kDa. Das entsprechende Gen auf dem Megaplasmid pHCG3 umfasst 1200 Nukleotide (Santiago et al. 1999). Am C-Terminus der CoxE-Sequenz befindet sich eine „von Willebrand-Faktor A“ (vWA) - Domäne (Staron 2008). Motive dieser Art spielen in der Assemblierung und Auflösung von Multiproteinkomplexen eine Rolle (Whittaker and Hynes 2002). Zusätzlich findet sich innerhalb dieser Ligandenbindestelle ein MIDAS-Motiv (metal ion dependent adhesion site), welches exakt der nach Lee et al. (1995) formulierten diskontinuierlichen Konsensus-Sequenz entspricht (L²³¹LDASGSMS, G²⁹⁶GTRI, V³²⁵SDGY; das Konsensus-Motiv ist markiert). Eine Funktion von CoxE bei der Reifung des bimetallischen Zentrums von CO-Dehydrogenase wurde bereits von Gnida et al. (2003) vermutet. So waren aufgereinigte CO-Dehydrogenase-Präparate des Mutantenstammes E::km nicht funktionell, enthielten aber ein Mo-Ion, welches vom MCD-Kofaktor koordiniert wird, sowie die beiden Eisen-Schwefel-Zentren und den FAD-Kofaktor. Der Gehalt an Cu war unterhalb des Detektionslimits, allerdings war das Präparat vollständig in Bezug auf cyanolysierbaren Schwefel (Meyer et al. 2000; Gnida et al. 2003).

Bisherige Analysen zeigten, dass in der *coxG*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 eine vollständig funktionelle CO-Dehydrogenase synthetisiert wird (Behrends 2000). Dennoch war die Assoziation des Enzyms mit der Innenseite der Cytoplasma-Membran beeinträchtigt. Dies führte zu der Annahme, dass CoxG eine Funktion als Membran-Anker besitzen könnte (Behrends 2000; Fuhrmann et al. 2003). Das Genprodukt selbst umfasst 205 Aminosäuren bei einer molekularen Masse von 21,6 kDa.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Die für die chemolithoautotrophe Nutzung von CO spezifischen Genprodukte werden vom *cox*-Gencluster auf dem Megaplasmid pHCG3 kodiert (Schübel et al. 1995; Santiago et al. 1999; Fuhrmann et al. 2003). Dieser enthält sowohl die Strukturgene der CO-Dehydrogenase, *coxMSL*, als auch den Subcluster *coxDEFG*. Dessen Genprodukte scheinen mit Ausnahme von CoxG eine wesentliche Funktion bei der posttranslationalen Reifung des aktiven Zentrums der CO-Dehydrogenase zu besitzen (Behrends 2000; Leuthäuser 2000; Ferner 2001; Freiberg 2001; Staron 2008; Pelzmann et al. 2009).

Pelzmann et al. (2009) konnten zeigen, dass CoxD eine wesentliche Rolle bei der Inkorporation des cyanolysierbaren Schwefels in das aktive Zentrum des Enzyms spielt. Anhand der Charakterisierung der *coxD*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 konnte bestätigt werden, dass in Abwesenheit von CoxD eine inaktive, Schwefel-defiziente CO-Dehydrogenase synthetisiert wird, welche ein [MoO₃]-Ion im aktiven Zentrum aufweist.

Ziel dieser Arbeit war es, die weitere Assemblierung des [CuSMoO₂] - Clusters von CO-Dehydrogenase zu analysieren und dabei insbesondere die Rolle von CoxF bei der posttranslationalen Reifung zu identifizieren. Hierzu wurden zunächst die Mutantenstämme *O. carboxidovorans* OM5 F::km und G::km hinsichtlich ihres CO-chemolithoautotrophen Stoffwechsels charakterisiert. Die Funktion von CoxF sollte darüber hinaus in der *coxG*-Mutante (als nachfolgendem Gen) ersichtlich werden. Die in den Mutantenstämmen synthetisierten CO-Dehydrogenasen sollten im Anschluss aufgereinigt und auf Aktivität und Funktionalität untersucht werden. Elementaranalysen sollten Hinweise auf die mögliche Beschaffenheit des aktiven Zentrums geben. Insbesondere für das Präparat der *coxF*-Mutante sollte durch die Anwendung spektroskopischer Verfahren, spezifischer Markierungsexperimente sowie Proteinkristallographie die Struktur des aktiven Zentrums gelöst werden, um Rückschlüsse auf die Funktion von CoxF bei der posttranslationalen Reifung ziehen zu können. Darüber hinaus wurde eine mögliche Rolle von CoxF bei der Kofaktor-Biosynthese untersucht.

Durch die *in silico* Analyse der Aminosäuresequenzen von CoxF und CoxG sollte in Zusammenschau mit der Sequenz von CoxD und CoxE ein Biosynthese-Modell entwickelt werden, welches die experimentellen Befunde unter Einbeziehung bioinformatischer Daten erklärt.

Um CoxF auf Proteinebene untersuchen zu können und zum Nachweis der vorhergesagten Funktionen sollten mittels heterologer Expression Strategien betrachtet

werden, das Protein in großen Mengen zu produzieren und aufzureinigen. Dabei sollte CoxF einerseits aus Einschlusskörpern von *E. coli* durch Solubilisierung und Rückfaltung gewonnen werden als auch durch Aufreinigung von rekombinantem, löslich gebildetem CoxF. Als Nachweissystem für das CoxF-Protein wurden spezifische Immunglobulin G - Antikörper hergestellt.

2 Materialien und Methoden

2.1 Chemikalien und Gase

Sofern nicht separat erwähnt wurden sämtliche verwendeten Chemikalien von den Firmen Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (München) bezogen. Es wurden Chemikalien mit den Reinheitsgraden „reinst“ oder „zur Analyse“ benutzt. Die eingesetzten Gase wurden von den Firmen Linde (Höllriegelskreuth) und Rießner (Lichtenfels) bezogen. Die Reinheit des CO betrug 2,3, die des CO₂ betrug 4,5. H₂ und N₂ wurden in der Reinheit 5,0 erhalten.

2.2 Organismen

In dieser Arbeit wurden die nachfolgend aufgeführten Bakterienstämme verwendet (Tab. 2-1):

Tabelle 2-1: Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> AD494(DE3)	$\Delta ara-leu7697 \Delta lacX74$ $\Delta phoAPvull phoR \Delta malF$ F'[lac ⁺ (lacI ^q)pro] trxB::km (DE3)	Derman et al. 1993
<i>Oligotropha carboxidovorans</i> OM5	coxBCMSLDEFGHIK, cbb, hox	Meyer und Schlegel 1978
<i>Oligotropha carboxidovorans</i> OM5 E::km	coxBCMSLDE::kmFGHIK, cbb, hox	Freiberg 2001
<i>Oligotropha carboxidovorans</i> OM5 F::km	coxBCMSLDEF::kmGHIK, cbb, hox	Leuthäuser 2000
<i>Oligotropha carboxidovorans</i> OM5 G::km	coxBCMSLDEFG::kmHIK, cbb, hox	Behrends 2000

2.3 Plasmide

In Tab. 2-2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgeführt:

Tabelle 2-2: Plasmide aus *O. carboxidovorans* und *E. coli*

Plasmid	Wirtsorganismus	Marker	Insert	Referenz
pHCG3	<i>O. c.</i> OM5	---	---	Kraut und Meyer 1988
pHCG3Ekm	<i>O. c.</i> OM5E::km	Km ^R	0,6 kb <i>Stu</i> I-Fragment in <i>coxE</i> ersetzt durch 1,2 kb <i>Sma</i> I-Km Fragment aus pUC4KIXX	Freiberg 2001
pHCG3Fkm	<i>O. c.</i> OM5F::km	Km ^R	1,2 kb <i>Sma</i> I-Fragment aus pUC4KIXX in <i>coxF</i>	Leuthäuser 2000
pHCG3Gkm	<i>O. c.</i> OM5G::km	Km ^R	1,2 kb <i>Sma</i> I-Fragment aus pUC4KIXX in <i>coxG</i>	Behrends 2000
pSL1	<i>E. coli</i> AD494(DE3)	Ap ^R	<i>coxF</i> in pET11a	Leuthäuser 2000

2.4 Konstruktion einer *coxF*-Insertionsmutante von *O. carboxidovorans* OM5

Das Gen *coxF* wird in *Oligotropha carboxidovorans* spezifisch durch CO als Induktor transkribiert (Santiago et al. 1999). Zur Aufklärung der physiologischen Funktion von CoxF ist es notwendig, eine *coxF*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 zu betrachten. Der Mutantenstamm *O. carboxidovorans* OM5 F::km wurde für diese Arbeit als Glycerinkultur der Stammsammlung des Lehrstuhls entnommen. Die Mutante wurde von S. Leuthäuser (Leuthäuser 2000) wie nachfolgend beschrieben, hergestellt. In einem ersten Schritt wurde ein rekombinantes Konstrukt des Vektors pET11a (Novagen, Heidelberg, Deutschland) hergestellt. Dieses Plasmid mit der Bezeichnung pETFG1 trägt auf einem 2,688 kb großen Insert eine 1141 Nukleotide umfassende Sequenz von *coxE* (*'coxE*), *coxF* und *coxG*. Das Insert konnte aus dem Vektor pCAC1 (Santiago et al. 1999) durch Restriktion mit *Hind*III und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung und Elution gewonnen werden. Der Vektor pET11a wurde ebenfalls mit *Hind*III linearisiert, anschließend dephosphoryliert, mit dem Insert aus pCAC1 ligiert und danach in *E. coli* DH5 α transformiert. Die Identifizierung

positiver Transformanden erfolgte über Plasmidpräparation und geeignete Restriktionsanalysen. Hierbei konnte durch Linearisierung mit *EcoRI* die Gesamtgröße des Plasmids ermittelt sowie durch *EcoRV*- und *SmaI*-Restriktion eine positive Insertion festgestellt werden. Verdau mit *EcoRV/DraI* und *BglIII* lieferten darüber hinaus Aussagen über die Orientierung des Fragments. Das resultierende Plasmid wurde als pETFG1 bezeichnet.

Im Plasmid pETFG1 wurde anschließend die *in-vitro* Mutagenese von *coxF* durchgeführt. Dabei wurde in die *SmaI*-Schnittstelle von *coxF* eine 1,2 kb Kanamycin-Resistenzkassette aus dem Plasmid pUC4-KIXX (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) inseriert. Nach Gewinnung der Resistenzkassette aus pUC4-KIXX über Anionenaustauschersäulen erfolgte ein Restriktionsverdau mit *SmaI*. Die resultierenden Fragmente konnten gelelektrophoretisch getrennt und das 1,2 kb Fragment schließlich eluiert werden.

Der Vektor pETFG1 wurde in gleicher Weise isoliert und mit *SmaI* restringiert, so dass die Insertion der Km-Kassette durch Ligation möglich war. Das Konstrukt wurde in *E. coli* DH5 α transformiert und positive Transformanden erneut durch Plasmidpräparation und anschließende Restriktionsanalysen mit *HindIII*, *SmaI* und *EcoRV/DraI* identifiziert. Ferner konnte durch Doppelhydrolysen mit *BglIII/XhoI* sowie *EcoRV/XhoI* und die jeweils resultierende Fragmentierung die Orientierung der Km-Kassette ermittelt werden. Das Plasmid, welches die mutierte Sequenz von *coxF* trägt, wurde als pETFG1Km bezeichnet.

Um Rückschlüsse auf die Rolle von *coxF* im CO-Stoffwechsel von *O. carboxidovorans* OM5 ziehen zu können, war es notwendig, die wildtypische Sequenz von *coxF* gegen die mutierte Sequenz auszutauschen. Die Übertragung von DNA ist in *O. carboxidovorans* nur über Konjugation möglich. Darüber hinaus muss es sich (zur Detektion des Sequenzaustausches) beim zu übertragenden Plasmid um ein Suizidplasmid handeln, so dass eine Replikation außerhalb von Enterobakterien nicht möglich ist. Als geeignetes Suizidplasmid für den konjugativen Transfer wurde pSUP201-1 verwendet (Simon et al. 1983). Dieses wurde wie auch pETFG1Km zunächst über Anionenaustauschersäulen präpariert. Anschließend erfolgte die Restriktion von pSUP201-1 mit *EcoRI*, die Behandlung mit Mung Bean-Nuklease (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland), um glatte Enden zu erzeugen, und die Dephosphorylierung. Der Vektor pETFGKm wurde mit *EcoRV* und *DraI* verdaut und die Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt. Das 4,5 kb große Fragment, welches '*coxE*, *coxF::Km*, *coxG* und eine Restsequenz aus pET11a enthielt, wurde eluiert und

ebenfalls mit Mung Bean-Nuklease behandelt. Das Fragment wurde danach mit pSUP201-1 ligiert und in den Mobilisierungsstamm *E. coli* S17-1 transformiert. Nach Selektion positiver Transformanten konnte die Insertion des 4,5 kb Fragmentes durch Plasmidpräparation und Restriktionsverdau bestätigt werden. Der modifizierte Vektor erhielt die Bezeichnung pSUPFKm. Im nächsten Schritt wurde pSUPFKm durch Konjugation von *E. coli* S17-1 in *O. carboxidovorans* übertragen. Dabei ist zu erwähnen, dass die *tra*-Gene von *E. coli* S17-1 im Chromosom integriert sind. Die für die Mobilisierung der DNA erforderlichen *mob*-Gene liegen auf pSUPFKm. Da dessen Replikationsursprung in *O. carboxidovorans* nicht erkannt wird, bleibt die genetische Information nur dann erhalten, wenn eine Integration in das Megaplasmid pHCG3 erfolgt. Nach konjugativem Transfer wurde auf heterotrophen Mineralmedium-Cm-Km-Platten selektiert. *O. carboxidovorans* besitzt eine natürliche Cm-Resistenz, das Wachstum des Donorstammes wird dagegen verhindert. Ferner können durch die Selektion auf Km nur Zellen mit integriertem *coxF::Km*-Konstrukt wachsen.

Die auf dem Plasmid pSUP201-1 kodierte Ampicillin (Ap) - Resistenz kann dazu genutzt werden zwischen Einfachcrossover und Doppelcrossover bei der Rekombination von pSUPFKm mit pHCG3 zu unterscheiden. Während bei einem Einfachcrossover das gesamte Plasmid integriert wird, kommt es bei einem Doppelcrossover nur zum (gewünschten) Austausch der wildtypischen *coxF*-Sequenz mit *coxF::Km*. Positive Insertionsmutanten sind Km-resistent und Ap-sensitiv. Der Nachweis der Sequenz *coxF::Km* im Megaplasmid erfolgte im Southern-Blot. Das mit Digoxigenin markierte 1,2 kb *Sma*I-Fragment aus dem Plasmid pUC4-KIXX, welches bei der Mutagenese von *coxF* Anwendung fand, wurde dabei als Sonde eingesetzt. Zunächst wurden Plasmidpräparationen der *coxF*-Mutante und des *O. carboxidovorans*-Wildtyps durchgeführt. Nach Restriktionsverdauen mit *Cla*I, *Eco*RV, *Hind*III und *Stu*I wurden die resultierenden Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Southern Transfer auf eine Nylonmembran (Hybond-N, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) übertragen. Nach Immobilisierung erfolgte die Hybridisierung mit der Digoxigenin-markierten DNA-Sonde.

Im Falle einer erfolgreichen Insertion der Km-Resistenzkassette in *coxF* wurden nach Restriktion Fragmente mit klar definierter Größe erwartet. Die erhaltenen Signale nach Hybridisierung konnten einwandfrei diesen Fragmenten zugeordnet werden. Als Positiv-Kontrolle diente ein 4,5 kb *Eco*RV-*Dra*I-Fragment aus pETFG1Km, das eine Sequenz aus '*coxE*, *coxF::Km* und *coxG* enthielt. Als Negativ-Kontrolle wurde pHCG3 aus *O. carboxidovorans* herangezogen. Somit konnte die Integration der Km-Resistenzkassette in *coxF* eindeutig bestätigt werden.

Die für die Konstruktion der *coxF*-Insertionsmutante von *O. carboxidovorans* OM5 verwendeten *E. coli*-Stämme sind in Tab. 2-3 aufgelistet.

Tabelle 2-3: *E. coli*-Stämme zur Konstruktion der *coxF*-Insertionsmutante

Stamm	Genotyp/Phänotyp	Referenz
DH5 α	ϕ 80dlacZAM15 <i>recA1</i> <i>endA1 gyrA96 thi-1</i> <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) <i>supE44 relA1 deoR</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169	Jessee 1986
S17-1	<i>pro thi hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>recA</i> RP 4-2 (Tcr::Mu- Kmr::Tn7)	Simon et al. 1983

Nachfolgende Tab. 2-4 gibt einen Überblick über die Plasmide, die für die Konstruktion der *coxF*-Insertionsmutante verwendet wurden.

Tabelle 2-4: Plasmide aus *E. coli* und *O. carboxidovorans* OM5 zur Konstruktion der *coxF*-Insertionsmutante

Plasmid	Marker	Insert	Referenz
pHCG3	<i>cox, hox, cbb</i>		Kraut und Meyer 1988
pCAC1	Ap ^R , <i>lacZ'</i> α T3, T7, f1 <i>ori</i>	5,7 kb <i>EcoRV</i> -Fragment aus pHCG3 in pBluescript I KS+	Santiago et al. 1999
pUC4-KIXX	Km ^R		Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
pET11a	Ap ^R		Novagen, Heidelberg, Deutschland
pETFG1	Ap ^R	2,7 kb <i>HindIII</i> -Fragment aus pCAC1 in pET11a	Leuthäuser 2000
pETFG1Km	Ap ^R , Km ^R	1,2 kb <i>SmaI</i> -Fragment aus pUC4-KIXX in pETFG1	Leuthäuser 2000
pSUP201-1	Ap ^R , Cm ^R		Simon et al. 1983
pSUPFkm	Ap ^R , Km ^R	4,5 kb <i>EcoRV-DraI</i> Fragment aus pETFG1Km in pSUP201-1	Leuthäuser 2000

2.5 Konstruktion einer *coxG*-Insertionsmutante von *O. carboxidovorans* OM5

Das für CoxG kodierende Gen im Subcluster *coxDEFG* wird wie im Fall für CoxF auch CO-spezifisch transkribiert (Santiago et al. 1999). Es ist darüber hinaus davon auszugehen, dass im Reifungsprozess des Metallclusters von CO-Dehydrogenase auf dem Niveau der Funktion von CoxG Rückschlüsse auf die Funktion von CoxF oder von CoxF im Zusammenhang mit CoxD und CoxE möglich sind. Unter diesem Gesichtspunkt wurde die CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* OM5 G::km gleichermaßen für Analysen herangezogen wie das Enzym aus der *coxF*-Mutante.

Der Stamm *O. carboxidovorans* OM5 G::km wurde als Glycerinkultur der Stammsammlung des Lehrstuhls entnommen. Die Mutante wurde von K. Behrends (Behrends 2000) wie nachfolgend erläutert, hergestellt. Wie auch bei CoxF wurde das *coxG*-Gen durch Insertion einer Kanamycin-Resistenzkassette inaktiviert. Diese Insertion sollte in die *BgIII*-Schnittstelle innerhalb des *coxG*-Gens auf dem Vektor pETFG1 erfolgen. Da dieses Plasmid eine weitere *BgIII*-Schnittstelle besitzt, war es zunächst erforderlich, diese durch Deletion eines 1,5 kb großen *EcoRV*-Fragments zu entfernen. Hierzu wurde ein Restriktionsverdau mit *EcoRV* durchgeführt und die Produkte dieses Verdaus elektrophoretisch mittels eines Agarose-Gels aufgetrennt. Das 6,9 kb große Fragment wurde schließlich ausgeschnitten, aus dem Gel eluiert und ligiert. Nach Transformation in *E. coli* DH5 α und der Selektion positiver Transformanten auf entsprechenden LB-Agarplatten konnte durch erneute Plasmid-Isolierung und Restriktionsverdaue die Deletion des 1,5 kb großen *EcoRV*-Fragments bestätigt werden. Der neue Vektor erhielt die Bezeichnung pETFG2.

Die Kanamycin-Resistenzkassette wurde aus dem Vektor pUC4-KIXX gewonnen. Dieser wurde präparativ aufgereinigt und mit *Bam*HI restringiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung der entstandenen Fragmente auf einem Agarose-Gel wurde das 1,6 kb große *Bam*HI-Fragment aus der Gelmatrix eluiert und in den Vektor pETFG2 kloniert. Dieser wurde dazu im Vorfeld aus *E. coli* DH5 α isoliert und mit *BgIII* restringiert. *BgIII*- und *Bam*HI-Schnittstellen sind miteinander kompatibel, so dass das linearisierte Plasmid pETFG2 mit dem 1,6 kb großen *Bam*HI-Fragment ligiert werden konnte. Die Kanamycin-Resistenzkassette konnte auf diesem Wege in pETFG2 eingebaut werden. Nach Transformation des Konstruktes in *E. coli* DH5 α und der Selektion positiver Transformanten konnte auch hier die erfolgreiche Insertion des Fragmentes durch Plasmid-Präparation und entsprechende Restriktionsverdaue (mit elektrophoretischer Auftrennung der Fragmente) bestätigt werden.

Das Konstrukt, in welchem das Leseraster des *coxG*-Gens unterbrochen vorliegt (*coxG::Km*), wurde als pETFG2km bezeichnet. Um *coxG* im homologen System *O. carboxidovorans* OM5 zu mutieren wurde der Vektor pETFG2km mit *DraI* und *EcoRV* restrinigiert und die Produkte des Verdaus mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Ein 5,2 kb großes Fragment, welches die Gene '*coxE*, *coxF* und *coxG::Km* enthielt, wurde aus der Gelmatrix eluiert und in den Vektor pSUP201-1 kloniert. Letzterer wurde hierzu im Vorfeld mit *EcoRV* linearisiert, überstehende Enden mit Mung Bean-Exonuklease entfernt und der Vektor dephosphoryliert. Nach Ligation des Fragmentes mit pSUP201-1 wurde das Konstrukt in *E. coli* S17-1 transformiert und positive Transformanten auf entsprechendem LB-Medium selektiert. Nach Überprüfung des korrekten Einbaus mittels Plasmid-Präparation und geeigneten Restriktionsanalysen erhielt der modifizierte Vektor die Bezeichnung pSUPGKm.

Das *coxG*-Gen sollte durch homologe Rekombination gegen *coxG::Km* ausgetauscht werden. Mittels Konjugation wurde pSUPGkm in *O. carboxidovorans* OM5 übertragen. Transkonjuganten wurden auf heterotrophem Mineralmedium mit Chloramphenicol (zur Selektion auf *O. carboxidovorans*) und Kanamycin (zur Selektion auf Exkonjuganten) identifiziert. Ein weiteres Screening auf Ampicillin-Resistenz konnte Exkonjuganten, bei denen das gesamte übertragene Plasmid durch Einfach-Crossover ins Genom integriert wurde, von solchen differenzieren, bei denen durch Doppel-Crossover lediglich das wildtypische *coxG*-Gen auf dem Megaplasmid pHCG3 durch das mutierte Gen *coxG::Km* ausgetauscht wurde. Diese Mutation konnte des Weiteren durch Hybridisierung spezifischer Restriktionsfragmente mit einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde, welche gegen die Resistenzkassette in *coxG::Km* gerichtet war, identifiziert werden. Das Megaplasmid pHCG3 wurde hierzu aus dem vermeintlichen Mutantenstamm isoliert und Restriktionsverdauen mit *EcoRV* und *StuI* unterzogen. Im Zuge dieser Verdaue sollten Fragmente mit Bereichen entstehen, welche nicht durch die Konjugation übertragen wurden, als auch jeweils ein Fragment mit dem mutierten Gen *coxG::Km*. Die Produkte der Restriktionsverdaue wurden elektrophoretisch aufgetrennt, mittels Southern Transfer auf eine Nylonmembran (Hybond-N, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) übertragen und nach Immobilisierung mit der Digoxigenin-markierten DNA-Sonde hybridisiert. Sowohl für den Restriktionsansatz mit *EcoRV* als auch für den Ansatz mit *StuI* konnten konkrete Fragmente mit der jeweils passenden, errechneten Größe erhalten werden, welche ein Hybridisierungssignal zeigten. Für das unter identischen Bedingungen mitgeführte Megaplasmid pHCG3 aus dem Wildtyp von *O. carboxidovorans* OM5 konnte als Negativ-Kontrolle kein Signal erhalten werden. Der erfolgreiche Austausch des *coxG*-Genes gegen die mutierte Variante *coxG::Km* konnte auf

diese Weise bestätigt werden. Der Mutantenstamm erhielt die Bezeichnung *O. carboxidovorans* OM5 G:km.

Die für die Konstruktion der *coxG*-Insertionsmutante verwendeten *E. coli*-Stämme entsprechen denen bei der Generierung der *coxF*-Mutante und sind in Kap. 2.4, Tab. 2-3 aufgeführt. Plasmide, die für die Konstruktion der *coxG*-Insertionsmutante herangezogen wurden, sind in Tab. 2-5 aufgelistet.

Tabelle 2-5: Plasmide aus *E. coli* und *O. carboxidovorans* OM5 zur Konstruktion der *coxG*-Insertionsmutante

Plasmid	Marker	Insert	Referenz
pHCG3	<i>cox, hox, cbb</i>		Kraut und Meyer 1988
pCAC1	Ap ^R , <i>lacZ'</i> α T3, T7, f1 <i>ori</i>	5,7 kb <i>EcoRV</i> -Fragment aus pHCG3 in pBluescript I KS+	Santiago et al. 1999
pUC4-KIXX	Km ^R		Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
pETFG1	Ap ^R	2,7 kb <i>HindIII</i> -Fragment aus pCAC1 in pET11a	Leuthäuser 2000
pETFG2	Ap ^R	1,5 kb <i>EcoRV</i> -Deletion in pETFG1	Behrends 2000
pETFG2Km	Ap ^R , Km ^R	1,6 kb <i>BamHI</i> -Fragment aus pUC4-KIXX in pETFG2	Behrends 2000
pSUP201-1	Ap ^R , Cm ^R		Simon et al. 1983
pSUPGkm	Ap ^R , Km ^R	5,2 kb <i>DraI/EcoRV</i> -Fragment aus pETFG2Km in pSUP201-1	Behrends 2000

2.6 Heterologe Genexpression von CoxF in *E. coli* AD494(DE3)/pSL1

Der in dieser Arbeit verwendete Stamm *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 lag als Glycerinkultur in der Stammsammlung des Lehrstuhls vor. Der Vektor pSL1 trägt dabei das *coxF*-Gen, so dass dieser Mutantenstamm es ermöglichen sollte, rekombinantes CoxF-Protein in großen Mengen zu produzieren. Die Mutante wurde wie nachfolgend beschrieben, von Sabine Leuthäuser (Leuthäuser 2000) hergestellt.

2.6.1 Subklonierung von *coxF* in den Vektor pET16b

Das rekombinante Plasmid pCAC3 (Santiago et al. 1999) trägt die kodierende Sequenz von *coxF*. Um ein Expressionssystem mit hohen Ausbeuten zu erhalten, wurde – auch im Hinblick auf eine einfache und schnelle Aufreinigung des Proteins – das *coxF*-Gen in den Expressionsvektor pET16b subkloniert. Dieser Vektor bot aufgrund seiner His-Tag-Leader-Sequenz die Möglichkeit CoxF als Fusionsprotein mit His-Tag zu exprimieren, so dass eine Aufreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie ermöglicht werden sollte. Aufgrund des Fehlens geeigneter Restriktionsschnittstellen war die Subklonierung von *coxF* aus pCAC3 in den Expressionsvektor pET16b allerdings zunächst nicht möglich. Es war erforderlich, am *coxF*-Gen 5'-terminal eine *NdeI*-Schnittstelle sowie 3'-terminal eine *BamHI*-Schnittstelle zu erzeugen. Nach Aufreinigung des Vektors pCAC3 aus *E. coli* DH5 α mittels Anionenaustauschersäulen wurde *coxF* hierzu unter Zuhilfenahme der Primer CoxF5 und CoxF3 (vgl. Tab. 2-6) mittels PCR amplifiziert und so die notwendigen Schnittstellen erzeugt. Im Anschluss erfolgte die Klonierung in den Expressionsvektor pET16b. Dabei wurden sowohl das *coxF*-PCR-Produkt, als auch das Plasmid pET16b gleichermaßen mit *NdeI* und *BamHI* restringiert. Die Produkte des Restriktionsverdaus wurden aufgereinigt und schließlich das *coxF*-Gen in den linearisierten Vektor kloniert. Zur Bestätigung der erfolgreichen Klonierung von *coxF* in pET16b wurde *E. coli* DH5 α mit dem Ligationsprodukt transformiert und positive Transformanten auf LB-Ap-Agarplatten selektiert. Nach Isolierung des Plasmids und geeigneten Restriktionsverdauen konnte mittels Agarose-Gelelektrophorese und den hierbei auftretenden Banden die erfolgreiche Insertion des *coxF*-Gens bestätigt werden. Das Ligationsprodukt aus pET16b und *coxF* erhielt die Bezeichnung pSL2.

Tabelle 2-6: verwendete Primer zur Subklonierung von *coxF* in den Expressionsvektor pET16b

Bezeichnung	Länge (Oligonukleotide)	Sequenz 5' → 3'	Kommentar
CoxF5	24	GGC CAT CAT ATG ACA CCT ACT CCT	<i>coxF</i> 5' site, <i>NdeI</i> -Schnittstelle
CoxF3	26	GGC CAT GGA TCC TCA GGA TGT TCC TT	<i>coxF</i> 3' site, <i>BamHI</i> -Schnittstelle

2.6.2 Subklonierung von *coxF* in den Vektor pET11a und Transformation in *E. coli* AD494(DE3)

Authentisches CoxF sollte gewonnen werden, indem *coxF* in den Expressionsvektor pET11a kloniert wurde. Dieser unterscheidet sich vom pET16b-Derivat pSL2 dadurch, dass keine *his*-Sequenz an das 5'-terminale Ende des *coxF*-Gens fusioniert wird, besitzt aber die gleichen Expressionssignale. Da ein His-Tag die korrekte Faltung des CoxF-Protein verhindern oder dessen Funktion (und ggf. eine eventuelle enzymatische Aktivität) beeinträchtigen könnte, sollte authentisches CoxF in einem geeigneten Expressionsstamm produziert werden.

Die Expressionsvektoren pET11a und pSL2 besitzen in ihren Klonierungsregionen identische Restriktionsschnittstellen. Beide Plasmide wurden aufgereinigt und mit *NdeI* und *BamHI* restringiert. Die Ansätze wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und entsprechende Fragmente aus der Gelmatrix eluiert. Das *coxF*-Fragment wurde schließlich mittels Ligation in den linearisierten Vektor pET11a kloniert. Der erfolgreiche Einbau des *coxF*-Gens wurde überprüft, indem das Ligationsprodukt in *E. coli* DH5 α transformiert wurde und positive Transformanten auf LB-Ap-Platten selektiert wurden. Im Anschluss wurde das Plasmid isoliert und Restriktionsanalysen (Verdau mit *NdeI* zur Linearisierung und Restriktion mit *NdeI* und *BamHI* zur Fragmentierung) unterzogen. Durch die elektrophoretische Auftrennung der Fragmente konnte das *coxF*-Gen schließlich eindeutig im Ligationsprodukt nachgewiesen werden. Das rekombinante Plasmid erhielt die Bezeichnung pSL1. Als geeignetes Expressionssystem für die rekombinante Produktion von CoxF wurde der Stamm *E. coli* AD494(DE3) gewählt, welcher mit dem Plasmid pSL1 transformiert wurde. Auch hier erfolgte die Selektion positiver Transformanten auf LB-Ap-Agarplatten.

Tab. 2-7 gibt einen Überblick über die *E. coli*-Stämme, die zur Erzeugung des heterologen Expressionssystems von CoxF verwendet wurden.

Tabelle 2-7: verwendete *E. coli* - Stämme zur Erzeugung des heterologen Expressionssystems von CoxF

Stamm	Genotyp/Phänotyp	Referenz
DH5 α	$\phi 80dlacZ\Delta M15$ <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> (r_K^- , m_K^+) <i>supE44</i> <i>relA1</i> <i>deoR</i> $\Delta(lacZYA-argF)U169$	Jessee 1986
AD494(DE3)	$\Delta ara-leu7697$ $\Delta lacX74$ $\Delta phoAPvull$ <i>phoR</i> $\Delta malF$ F' <i>[lac⁺(lacI^q)pro]</i> <i>trxB::km</i> (DE3)	Derman et al. 1993

Plasmide, die für die Konstruktion des Expressionsstammes *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 verwendet wurden, sind in Tab. 2-8 aufgeführt.

Tabelle 2-8: Plasmide aus *E. coli* und *O. carboxidovorans* zur Konstruktion des Expressionsstammes *E. coli* AD494(DE3)/pSL1

Plasmid	Marker	Insert	Referenz
pCAC3	Ap ^R , <i>lacZ'</i> α T3, T7, f1 <i>ori</i>	3,2 kb <i>SalI</i> -Fragment aus pCAC1 in pBlueskript I KS+	Santiago et al. 1999
pET11a	Ap ^R		Novagen, Heidelberg, Deutschland
pET16b	Ap ^R		Novagen, Heidelberg, Deutschland
pSL1	Ap ^R	<i>coxF</i> in pET11a	diese Arbeit
pSL2	Ap ^R	<i>coxF</i> in pET16b	diese Arbeit

2.7 Anzucht von Bakterien

2.7.1 Anzucht von *O. carboxidovorans* OM5 (Wildtyp und Mutanten)

Für die Anzucht von *O. carboxidovorans* OM5 wurde das Mineralmedium nach Meyer und Schlegel (1983) in modifizierter Form verwendet. Die Konzentration der Bestandteile der

Spurenelementlösung wurde dabei um das 5-fache erhöht. Für das Wachstum heterotropher Kulturen wurde das Mineralmedium mit 0,5 % (w/v) Na-Pyruvat und 0,3 % (w/v) Nutrient Broth supplementiert. Feste Nährböden wurden durch Zugabe von 16 g Agar / L hergestellt.

Mineralmedium:

(nach Meyer und Schlegel 1983)

Na ₂ HPO ₄ wasserfrei	213,6	g
KH ₂ PO ₄	90,0	g
NH ₄ Cl	90,0	g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	24,0	g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2,4	g
Fe(III)-NH ₄ -Citrat	1,2	g
TS 3 Lösung	60	ml
VE-H ₂ O	60	L

Spurenelementlösung TS 3:

(modifiziert nach Meyer und Schlegel 1983)

ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	125	mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	37,5	mg
H ₃ BO ₃	375	mg
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	250	mg
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	125	mg
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	125	mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	1080	mg
Na ₂ SeO ₃	25	mg
NaVO ₃ x H ₂ O	125	mg
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	125	mg
H ₂ O dest.	ad 1000	ml

Flüssigkulturen wurden unter entsprechenden Gasatmosphären in Witt'schen Töpfen kultiviert. Die Zusammensetzung der Gasatmosphären für verschiedene Wachstumsbedingungen kann Tab. 2-9 entnommen werden.

Tabelle 2-9: Wachstumsbedingungen für *O. carboxidovorans* - Flüssigkulturen und Zusammensetzung der zugehörigen Gasatmosphäre

Wachstumsbedingungen	Gasatmosphäre in % (v/v)
CO-autotroph	50 Luft, 45 CO, 5 CO ₂
H ₂ -autotroph	50 Luft, 40 H ₂ , 10 CO ₂
H ₂ -autotroph mit CO als Induktor	35 Luft, 30 CO, 30 H ₂ , 5 CO ₂

Das Wachstum erfolgte unter ständiger Rührung bei einer Temperatur von 30 °C und wurde durch Messung der optischen Dichte bei 436 nm spektralphotometrisch (Novaspec II, Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) verfolgt. Die Proben wurden dabei gegen unbeimpftes Medium als Referenz abgeglichen.

Die Teilungsrate kann aus der optischen Dichte nach Gleichung 3 berechnet werden:

$$V = \frac{\log OD_2 - \log OD_1}{\log 2 \cdot \Delta t} \quad (3)$$

Δt : Zeit zwischen den Messpunkten von OD₁ und OD₂

Die Generationszeit ergibt sich als Kehrwert der Teilungsrate:

$$g = \frac{1}{V} \quad (4)$$

Für die Kultivierung von Mutantenstämmen von *O. carboxidovorans* OM5 wurde dem Mineralmedium Kanamycin (Arbeitskonzentration 500 µg/ml in H₂O) und Chloramphenicol (Arbeitskonzentration 34 µg/ml in EtOH) zugegeben und damit selektive Bedingungen für das Wachstum geschaffen. Die Stammlösungen wurden im Vorfeld sterilfiltriert (Spritzenfilter: Celluloseacetat, Porendurchmesser 0,22 µm, Roth, Karlsruhe, Deutschland) und bis zur Verwendung in sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei -20 °C aufbewahrt. Medien für selektive Agar-Platten wurden nach der Dampfsterilisation auf 50 °C abgekühlt und anschließend mit den Hitze-sensitiven Antibiotika supplementiert.

Die Vorkulturen der *O. carboxidovorans* - Stämme wurden in 300 ml Mineralmedium in einem 1 L - Erlenmeyerkolben angezogen. Die weitere Anzucht erfolgte in Fermentoren (Braun Biostat U, Braun, Melsungen, Deutschland) in 30 L bzw. 50 L Mineralmedium. Das Animpfen mit der 300 ml - Vorkultur erfolgte mit den zum Fermentor gehörenden Animpfbesteck unter strikter Einhaltung steriler Kautelen. Die Fermentation wurde bei 30 °C und einer Gasflussrate von 2 L/min durchgeführt. Während des Fermentationsprozesses wurde die Rührgeschwindigkeit von 150 rpm zu Beginn kontinuierlich bis auf 350 rpm erhöht, um eine gleichmäßige Durchmischung des Mediums zu gewährleisten. Der pH-Wert sollte während der Fermentation in einem Bereich von 7,0 bis 7,2 liegen und konnte bei starkem Absinken mit NaOH korrigiert werden.

2.7.2 Anzucht von *E. coli*

Stämme von *E. coli* wurden in Luria-Bertani (LB)-Medium (Sambrook et al. 1989) angezogen. Die Anzucht erfolgte bei einer Temperatur von 30 °C.

LB-Medium:

Pepton, tryptisch verdaut	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml, pH 7,5

Zur Herstellung fester Nährböden wurden pro Liter LB-Medium 15 g Agar (Roth, Karlsruhe, Deutschland) zugegeben.

E. coli AD494(DE3)/pSL1 besitzt eine Plasmid-kodierte Ampicillin und Kanamycin-Resistenz. Durch die Zugabe der entsprechenden Antibiotika können somit selektive Wachstumsbedingungen geschaffen werden. Ampicillin wurde in einer Arbeitskonzentration von 200 µg/ml (Stammlösung 200 mg/ml), Kanamycin in einer Arbeitskonzentration von 100 µg/ml (Stammlösung 100 mg/ml) zugegeben.

Die Anzucht erfolgte in sterilen Flüssigmedien in Erlenmeyerkolben mit Schikanen und Wattestopfen auf einem Rotationschüttler (Braun, Melsungen, Deutschland) und wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm spektralphotometrisch (Novaspec II,

Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) verfolgt. Die Proben wurden dabei gegen unbeimpftes Medium als Referenz abgeglichen.

Größere Zellmassen konnten durch Anzucht in einem Fermentor (Biostat U, Braun, Melsungen, Deutschland) erhalten werden (Arbeitsvolumen 30 - 50 L). Das hierfür benötigte Medium wurde dampfsterilisiert und mit einer über Nacht angezogenen Flüssigkultur ($OD_{600} \approx 3$) im Verhältnis 1:50 beimpft. Das Medium wurde mit steriler Luft bei einer Flussrate von 2 L/min durchströmt, um aerobe Wachstumsbedingungen zu gewährleisten. Die Rührung wurde von anfangs 150 rpm im Verlauf der Fermentation bis auf 450 rpm erhöht. Eine zu starke Schaumbildung während der Fermentation konnte verhindert werden, indem 0,25 ml sterilisiertes Antischaum-Mittel (Silikonöl-Wasser Gemisch, Verhältnis 2:1) pro Liter Medium zugegeben wurden.

2.8 Ernte und Lagerung der Zellen

O. carboxidovorans (Wildtyp und Mutanten) und *E. coli* wurden während der exponentiellen Wachstumsphase abgeerntet. Dabei lag für *O. carboxidovorans* die optische Dichte bei 436 nm (OD_{436}) zwischen 6,75 und 10,97. *E. coli* wurde bei einer OD_{600} von 1,23 bis 1,68 abgeerntet. Mit Hilfe einer Durchlaufzentrifuge (20.000 rpm; CEPA Z41, Carl Padberg Zentrifugenbau GmbH, Lahr, Deutschland) wurde das Zellmaterial abzentrifugiert (Durchlaufgeschwindigkeit 360 ml/min) und die erhaltene, feuchte Zellmasse zur Lagerung in Petrischalen portioniert und bei -80 °C eingefroren.

2.9 Stammhaltung

Reinkulturen der verschiedenen Bakterienstämme (*O. carboxidovorans* und *E. coli*) wurden auf Agarplatten mit entsprechendem Selektivmedium (Kap. 2.7) angezüchtet, bei 4 °C gelagert und etwa alle vier Wochen überimpft. Zur dauerhaften Lagerung der Arbeitsstämme wurden Glycerinkulturen angelegt. 600 µl einer über Nacht (*E. coli*) bzw. zwei Tage (*O. carboxidovorans*, heterotrophes Medium) angezogenen Flüssigkultur wurden mit 800 µl Glycerin (86 %, v/v) vermischt und bei -80 °C aufbewahrt.

2.10 Das pET-Expressionssystem zur heterologen Genexpression in *E. coli*

Zur Überexpression rekombinanter Proteine in *E. coli* können pET-Vektoren verwendet werden. Die entsprechenden Gene werden hierfür unter die Kontrolle der Transkriptions- und Translationssignale des Bakteriophagen T7 gestellt. Somit kann die Expression der Fremdgene durch die T7-RNA-Polymerase im Wirtsorganismus induziert werden.

Der in dieser Arbeit verwendete Stamm *E. coli* AD494(DE3) zeichnet sich zudem durch die Insertion des Kanamycin-Resistenzgenes in *trxB* aus, welches für die Thioredoxin-Reduktase kodiert. Das Ausschalten dieses Gens ermöglicht die Ausbildung von Disulfid-Brücken im Cytoplasma, und somit die richtige Faltung eines S-S-Proteins. Der Prozentsatz an unlöslichem Protein in Form von Einschlusskörpern kann auf diese Weise reduziert werden.

Für die Überexpression wurde selektives LB-Medium mit einer Vorkultur von *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 beimpft und das Wachstum bei 30 °C photometrisch verfolgt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,7 wurde zur Induktion 1 mM Isopropyl-β-thiogalaktopyranosid (IPTG) zugegeben und das Wachstum weiter verfolgt. 3 - 4 h nach Induktion wurden die Zellen wie unter Kap. 2.8 beschrieben, schließlich abgeerntet.

Um den Verlauf der Überexpression verfolgen zu können wurden während der gesamten Fermentation in halbstündigem Abstand Proben entnommen. Ein Volumen entsprechend einer OD₆₀₀-Einheit wurde jeweils abzentrifugiert (15.000 x g, 4 °C, 1 min; Kühlzentrifuge 5402, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und die Pellets mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Kap. 2.17) hinsichtlich der Bildung von CoxF analysiert.

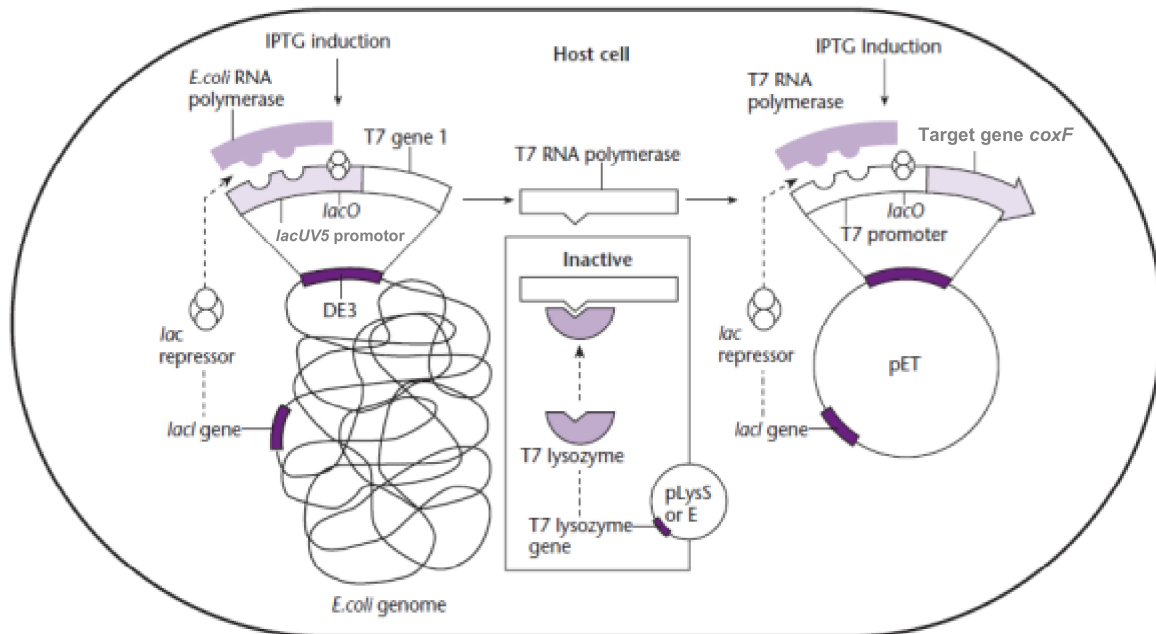


Abbildung 2-1: pET-Expressionssystem für die Überexpression von CoxF in *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 (verändert aus Primrose und Twyman 2006).

Der Expressionstamm trägt auf dem pET-Vektor pSL1 das Zielgen *coxF*, welches sich unter der Kontrolle T7lac-Hybridpromotors befindet. Dieser setzt sich aus einer 17 Basenpaare großen Sequenz des T7-Promotors sowie einer 25 Basenpaare großen Operatorsequenz des lac-Operons (*lacO*) zusammen. Die Expression des Zielgens wird über die T7-RNA-Polymerase induziert. Der Wirtstamm ist dabei ein Lysogen des Bakteriophagen λ DE3, das T7-RNA-Polymerase-Gen steht unter der Kontrolle des induzierbaren *lacUV5* Promotors. Beide lac-Operatoren werden durch spezifische lac-Repressor-Moleküle (LacI) besetzt, wodurch sowohl die Expression der T7-RNA-Polymerase als auch die Expression von CoxF inhibiert wird. Die Gene für den Lac-Repressor finden sich auf dem *E. coli* - Chromosom und auf dem pET-Vektor. Durch Zugabe des künstlichen Induktors Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) löst sich der lac-Repressor, die T7 RNA-Polymerase wird zunächst exprimiert. Diese ermöglicht dann ihrerseits die Expression von CoxF auf pSL1. Die gesamten Reserven der Wirtszelle werden nun für die Expression des Fremdgens verwendet.

2.11 Zellaufschluss und Herstellung von Extrakten

Vor dem eigentlichen Aufschluss wurde tiefgefrorenes Zellmaterial von *O. carboxidovorans* (Wildtyp und Mutanten) oder *E. coli* zunächst in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ pH 7,2 bzw. 50 mM HEPES/ NaOH pH 7,2 unter Rührung und Eiskühlung aufgetaut und resuspendiert (1,5 ml Puffer / g Zellenmasse). Der Zellsuspension wurden anschließend EDTA in einer Endkonzentration von 1 mM und eine Spatelspitze DNase I zugegeben. Beim Aufschluss von *E. coli* - Zellen wurde auf den Zusatz von EDTA verzichtet. Die Zellsuspension wurde danach

in einem Potter-Elvehjem-Handhomogenisator (Braun, Melsungen, Deutschland) homogenisiert.

Der Zellaufschluss mittelgroßer Zellmengen (5 - 100 g) erfolgte unter stetiger Kühlung mittels 5-7-maliger (*E. coli*) bzw. 10-maliger (*O. carboxidovorans*) Passage durch eine vorgekühlte French Press Zelle (American Instruments Company, Silver Spring, Maryland, USA) bei einem Druck von 900 bis 1.100 bar. Um zellfreie Extrakte zu erhalten wurden nicht-aufgeschlossene Zellen, Zelltrümmer und subzelluläre Partikel (z. B. Einschlusskörper) mittels niedertouriger Zentrifugation (14.000 x g, 30 min, 4 °C) abgetrennt. Der zellfreie Rohextrakt wurde einer Ultrazentrifugation (100.000 x g, 2 h, 4 °C; Centricon T-1045, Rotor Ti50 / Ti 4594, Kontron, Eching, Deutschland) unterzogen, um Cytoplasma und Membranfraktion voneinander zu trennen. Letztere konnte in Puffer erneut aufgenommen, resuspendiert und in einem Potter-Elvehjem-Handhomogenisator (Braun, Melsungen, Deutschland) homogenisiert werden. Cytoplasmatische und Membranfraktion wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C tiefgefroren.

Extrakte aus großen Zellmengen (150 - 300 g Zellen) wurden durch Zellaufschluss mit einem Hochdruck-Homogenisator (Modell MINI-LAB, Typ 8.30 H, Rannie AS, Kopenhagen, Dänemark) erhalten. Die tiefgefrorene Zellmasse wurde hierzu in analoger Weise in Puffer aufgetaut, resuspendiert und homogenisiert und mittels kontinuierlichem Durchlauf für ca. 2 h bei einem Druck von 600 bis 800 bar aufgeschlossen.

2.12 Aufbereitung / Waschen der Membranfraktionen

Zur Entfernung von Resten der cytoplasmatischen Fraktion aus den Membranfraktionen wurden die homogenisierten Membranen (Kap. 2.11) jeweils einer weiteren Ultrazentrifugation (100.000 x g, 1 h, 4 °C; Centricon T-1045, Rotor Ti50 / Ti 4594, Kontron, Eching, Deutschland) unterzogen. Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten Membranen erneut mit Hilfe eines Potter-Elvehjem-Handhomogenisator (Braun, Melsungen, Deutschland) in Puffer (50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 oder 50 mM KH₂PO₄/NaOH pH 7,2) homogenisiert. Dieser Waschschrift wurde mindestens dreimal wiederholt, ehe die jeweilige Membranfraktion in Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff (-196 °C) schockgefroren und bei -80 °C gelagert wurde.

2.13 Zellaufschluss durch Permeabilisierung der Zellwand mit Triton X-100

Zur Analyse in Saccharosedichtegradienten wurden Rohextrakte und lösliche Fraktionen durch Permeabilisierung der Zellwand hergestellt. Hierzu wurde das Detergenz Triton X-100 eingesetzt, welches die Zellwand destabilisiert und die Zelle somit „zum Auslaufen“ bringt. Zellmaterial von *O. carboxidovorans* OM5 wurde zunächst auf Eis in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ pH 7,2 suspendiert (1 g / 1,5 ml Puffer) und mittels eines Potter-Elvehjem-Handhomogenisator (Braun, Melsungen, Deutschland) homogenisiert. Nach Zugabe von 1 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ und einer Spatelspitze DNase I wurden 2 % (v/v) Triton X-100 zupipettiert und die Suspension unter leichtem Schütteln 2 h bei 30 °C inkubiert. Lösliche Extrakte („Pseudo“-Cytoplasma) konnten durch niedertourige Zentrifugation (10.000 rpm, 30 min, 4 °C) erhalten werden. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand für Analysen abgenommen und das Pellet verworfen.

Durch Zugabe von $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ wird die Zellwand von *O. carboxidovorans* OM5 durch die Komplexbildung zweiwertiger Ionen zunächst destabilisiert. Die Inkubation mit Triton X-100 bewirkt eine Permeabilisierung der Zellwand, die löslichen Bestandteile der Zelle (also das Cytoplasma) können aus der Zelle austreten. Zurück bleibt eine Zellhülle („Ghost“), die nur noch aus Zellwandbestandteilen und Membranen besteht.

2.14 Gewinnung von rekombinantem CoxF aus *E. coli* AD494(DE3)/pSL1

2.14.1 Produktion von rückgefaltetem CoxF aus Einschlusskörpern

Präparation von Einschlusskörpern

Der nach Zellaufschluss (Kap. 2.11) erhaltene Rohextrakt wurde zunächst lichtmikroskopisch auf das Vorhandensein nicht-aufgeschlossener Zellen überprüft. Im Falle eines nahezu vollständigen Aufschlusses ohne verbleibende intakte Zellen wurden die im Rohextrakt enthaltenen Einschlusskörper durch niedertourige Zentrifugation (9.000 x g, 20 min, 4 °C) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet (zur Abtrennung von Kontaminationen durch lösliche Proteine und Membranpartikel) in Eis-gekühltem Waschpuffer aufgenommen und in einem Potter-Elvehjem-Handhomogenisator (Braun, Melsungen, Deutschland) homogenisiert. Der Zentrifugationsschritt wurde anschließend bei

7.500 x g wiederholt, der Überstand sowie eine viskose graue Phase oberhalb des Sediments verworfen und das Pellet in Waschpuffer homogenisiert. Es folgten zwei weitere Waschschrirte, wobei die Zentrifugationen bei 5.000 x g durchgeführt wurden. Durch zweimalige Behandlung mit 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 konnte schließlich das Detergenz entfernt werden. Die gewaschenen Einschlusskörper konnten je nach Bedarf in unterschiedliche Puffer aufgenommen und homogenisiert werden und zur Lagerung in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden. Der Verlauf der Präparation wurde über denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Kap. 2.17) verfolgt.

Waschpuffer:

50 mM HEPES/NaOH pH 7,2

1,5 % Triton X-100

10 mM Na₂-EDTA

150 mM NaCl

Rückfaltung von rekombinantem CoxF

Rekombinantes CoxF aus Einschlusskörpern wurde nach der Methode von Lin (2000) rückgefaltet. Zunächst wurden gewaschene CoxF-Einschlusskörper durch Zentrifugation bei 25.000 x g und 30 min bei 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in einem entsprechenden Volumen an Solubilisierungslösung aufgenommen, um eine Proteinkonzentration von ca. 5 mg/ml zu erhalten, und mittels eines Potter-Elvehjem-Handhomogenisator (Braun, Melsungen, Deutschland) homogenisiert. Der Ansatz wurde anschließend 1 h auf Eis gerührt. Zur Abtrennung ungelöster Bestandteile (Aggregationskeime) wurde die Lösung zuerst zentrifugiert (25.000 x g, 60 min, 4 °C), schließlich ultrafiltriert (Rotilabo Spritzenfilter, 0,22 µm, PVDF, Roth, Deutschland) und danach unter Rührung tropfenweise zu Eis-gekühlter, sterilfiltrierter 20 mM Tris-Lösung gegeben. Die CoxF-Rückfaltungslösung wurde dabei um das 50-fache verdünnt. Der pH-Wert wurde nach der Zugabe mit 1 N HCl auf 9,0 eingestellt. Für die weitere Rückfaltung wurde die verdünnte CoxF-Lösung auf einer Temperatur von 4 °C gehalten und der pH-Wert alle 24 h um 0,2 Einheiten bis pH 8,0 gesenkt. Über UV-Spektren (UV/VIS-Spektralphotometer Evolution 300, Thermo Scientific, Madison, Wisconsin, USA) wurde die Löslichkeit von CoxF durch Messung der Trübung im sichtbaren Bereich überprüft. Die Konzentration des

solubilisierten CoxF-Proteins konnte nach der Bradford-Methode bestimmt werden (Kap. 2.16.3) sowie über den aus der Aminosäuresequenz abgeleiteten Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{280} = 12.950 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei 280 nm berechnet werden.

Solubilisierungslösung:

8 M	Harnstoff
0,1 M	Tris
1 mM	EDTA
1 mM	Glycin
10 mM	β -Mercaptoethanol
10 mM	Dithiothreitol
1 mM	reduziertes Glutathion

2.14.2 Anreicherung von löslichem CoxF über Gelfiltration

Zur Gewinnung von Cytoplasma wurde Zellmaterial von *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 nach Zellaufschluss und der anschließenden niedertourigen Zentrifugation einer Ultrazentrifugation unterzogen (Kap. 2.11). Die so erhaltene cytoplasmatische Fraktion mit löslichem CoxF wurde zur Anreicherung des rekombinanten Proteins einer Gelfiltration an einer HiPrep 26/60 Sephacryl S-400 High Resolution Säule (Bettvolumen 245 ml, äquilibriert mit 500 ml 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden) unterzogen. Das aufgetragene Probenvolumen betrug 10 ml, es wurden Fraktionen zu je 2,8 ml bei einer Flussrate von 1 ml/min gesammelt. Der Säulenlauf erfolgte an einem ÄKTAprime purifier System (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden). Nach Auftragen der Probe wurde die Säule mit 500 ml Äquilibrationpuffer gespült und die im Extrakt enthaltenen Proteine bzw. Proteinkomplexe gemäß ihrer stokeschen Radien getrennt.

Durch Aufnahme des relativen Proteinprofils (A_{280}) wurde der Verlauf der Gelfiltration verfolgt. Die einzelnen Fraktionen wurden im Anschluss des Säulen-Laufs zudem einer denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließendem Immunoblot unterzogen (vgl. Kap. 2.17, 2.18 und 2.22). Mittels spezifischer Anti-CoxF-Immunoglobulin G Antikörper konnte so der relative Gehalt an CoxF in den jeweiligen Fraktionen bestimmt werden. Zur Auswertung wurde das Programm ImageJ verwendet (vgl. Kap. 2.23).

Die Fraktionen von Protein-Peaks, die CoxF enthielten, wurden schließlich vereinigt und bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Um die molekulare Masse des CoxF-Proteins bzw. eventuell auftretender Oligomere bestimmen zu können, wurde eine Lösung mit Marker-Proteinen einem Gelfiltrationslauf unter identischen Bedingungen unterzogen und über deren Mobilität eine Eichgerade erstellt.

Marker-Proteine: Rinderserumalbumin (BSA), 67 kDa
 Alkohol-Dehydrogenase, 141 kDa
 Katalase, 232 kDa
 CO-Dehydrogenase, 277 kDa

2.15 Aufreinigung von CO-Dehydrogenase mittels Säulenchromatographie

2.15.1 Anionenaustauschchromatographie an Macro-Prep High Q

Nach Zellaufschluss von *O. carboxidovorans* OM5 (Wildtyp und Mutanten) konnte durch eine nachfolgende Ultrazentrifugation das Cytoplasma gewonnen werden, in welchem CO-Dehydrogenase zu einem Anteil von 5 - 10 % vorhanden ist. Zur Anreicherung des Enzyms wurde als erster Schritt die cytoplasmatische Fraktion einer Anionenaustauschchromatographie an einer Macro-Prep High Q-Säule (500 ml Bettvolumen, in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ pH 7,2 äquilibriert; BIO-RAD Laboratories, Hercules, USA) unterzogen. Ein Gesamtvolumen von 439 ml wurde aufgetragen und Fraktionen mit einem Volumen von 18 ml gesammelt. Die Flussrate betrug 8 ml/min. Der Säulenlauf erfolgte an einem ÄKTAprime plus purifier System (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden). Nach dem Probenauftrag wurde die Säule mit 2,0 L Äquilibrationpuffer gespült, um nicht oder nur schwach gebundene Proteine zu eluieren. Durch Anlegen eines Gradienten von 0 bis 1 M KCl in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ pH 7,2 (insgesamt 2,2 L) wurde gebundenes Protein eluiert.

Die Aufreinigung wurde durch Aufnahme des relativen Proteinprofils (A_{280}) verfolgt. Ferner wurde die tatsächliche Leitfähigkeit über den gesamten Chromatographie-Lauf aufgezeichnet. Die CO-Dehydrogenase enthaltenden Fraktionen wurden visuell anhand der

typisch braunen Färbung der Fraktionen ermittelt, als auch mittels denaturierender PAGE und nachfolgendem Immunoblot (Kap. 2.17, 2.18 und 2.22). Dieser wurde mit bereits am Lehrstuhl für Mikrobiologie vorhandenen Anti-CODH-IgGs durchgeführt und ermöglichte eine eindeutige Identifizierung der CO-Dehydrogenase-Fraktionen.

2.15.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) an Butyl Sepharose 4 Fast Flow

Die nach der Anionenaustauschchromatographie vereinigten Fraktionen (229 ml) wurden in einem zweiten Anreicherungsschritt einer hydrophoben Interaktionschromatographie an Butyl-Sepharose 4 Fast Flow unterzogen. Vor der eigentlichen Chromatographie wurde die Proteinlösung zunächst mit 200 mM Na₂-EDTA auf eine Endkonzentration von 1 mM Na₂-EDTA gebracht. Unter Rührung auf Eis wurde über einen Zeitraum von 30 min 4,05 M (NH₄)₂SO₂ zugetropft bis zu einer Endkonzentration von 1,21 M. Die Lösung wurde eine weitere Stunde auf Eis gerührt und das präzipitierte Protein durch niedertourige Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 16.000 rpm (Kontron Centrikon T-124, Rotor A 8.20) abgetrennt. Der Überstand, welcher die CO-Dehydrogenase enthielt, wurde auf eine Butyl-Sepharose 4 Fast Flow Säule (XK50, Bettvolumen 200 ml; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden) aufgetragen, welche im Vorfeld mit 0,85 M (NH₄)₂SO₂ in 50 mM KH₂PO₄/NaOH pH 7,2 und 1 mM Na₂-EDTA äquilibriert wurde. Nach dem Probenauftrag (285 ml) wurde die Säule mit 700 ml Äquilibrierungspuffer gespült, um nicht oder nur schwach gebundene Proteine zu eluieren. Durch Anlegen eines linearen Gradienten von 0,85 bis 0 M (NH₄)₂SO₂ und 0 bis 30 % (v/v) Isopropanol in 50 mM KH₂PO₄/NaOH pH 7,2 (insgesamt 1,6 L) wurde schließlich das gebundene Protein eluiert. Die Chromatographie erfolgte an einem ÄKTAprime plus purifier System (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden) bei einer Flussrate von 8 ml/min und einem Fraktionsvolumen von 18 ml. Die CO-Dehydrogenase enthaltenden Fraktionen wurden visuell anhand der typisch braunen Färbung des Proteins ermittelt, als auch mittels denaturierender PAGE und nachfolgendem Immunoblot (Kap. 2.17, 2.18 und 2.22). Dieser wurde mit bereits am Lehrstuhl für Mikrobiologie vorhandenen Anti-CODH-IgGs durchgeführt und ermöglichte eine eindeutige Identifizierung der CO-Dehydrogenase-Fraktionen. Die entsprechenden Fraktionen wurden anschließend vereinigt.

2.15.3 Gelfiltration zum Entsalzen und Umpuffern von Proteinlösungen

Nach Vereinigung der CO-Dehydrogenase Fraktionen wurde die erhaltene Proteinlösung (160 ml) durch Gelfiltration an einer Sephadex G25 Säule (915 ml Bettvolumen; XK50, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden) in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 umgepuffert. Der Probenauftrag erfolgte mit Hilfe einer Pharmacia LKB-Pumpe P1 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) mit einer Flussrate von 1,2 ml/min. Die Sephadex G25 Säule wurde zuvor mit 1,35 L (1,5-faches Bettvolumen) 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 äquilibriert. Nach Auftragen der Probe wurde mit Äquilibrationpuffer gespült und CO-Dehydrogenase enthaltende Fraktionen anhand der typischen Braun-Färbung visuell identifiziert und vereinigt.

2.15.4 Aufkonzentrieren von Proteinlösungen

Nach Umpuffern der CO-Dehydrogenase-Lösung in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 wurde das Protein durch Ultrafiltration an einer Membran mit 30 kDa-Ausschlussgrenze (Ultrafiltrationskammer, Modell 8400, Amicon, Witten, Deutschland) aufkonzentriert. Die Lösung wurde unter ständiger Rührung sowie Eiskühlung durch Anlegen eines Drucks von 1,5 bar auf eine Konzentration von 10 - 15 mg/ml gebracht. Nach Aufkonzentrieren wurde die CO-Dehydrogenase aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

2.16 Methoden zur Proteinbestimmung

2.16.1 Bestimmung des Proteingehalts über den Flavingehalt (A_{450})

Die Konzentration Flavin-haltiger Proteine kann durch das Messen der Absorption bei 450 nm (A_{450}) ermittelt werden (Coughlan 1980; Meyer und Rohde 1984). Bei dieser Wellenlänge besitzt FAD ein Absorptionsmaximum. Mit Hilfe des entsprechenden millimolaren Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{450} = 72,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kann über das Lambert-Beer'sche Gesetz unter Berücksichtigung der Schichtdicke der verwendeten Küvette und des Molekulargewichts des Proteins dessen Gehalt in einer Lösung ermittelt werden.

2.16.2 Proteinbestimmung nach Beisenherz et al. (1953)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Suspensionen ganzer Zellen oder in Rohextrakten wurde nach Beisenherz et al. (1953) durchgeführt. In Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurden 100 µl Probe mit 150 µl H₂O_{dest} und 50 µl 2 M NaOH versetzt und 4 min im Wasserbad oder Heizblock (TB1, Whatman Biometra, Göttingen, Deutschland) bei 100 °C gekocht. Nach Abkühlen der Probe auf Eis wurden 50 µl 4 M Trichloressigsäure dazu gegeben und gut durchmischt. Die Zugabe der Trichloressigsäure führt zum Ausfällen des Proteins. Durch Zentrifugation der Ansätze für 10 min bei 14.000 rpm (Centrifuge 5402, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) konnte das Protein pelletiert werden. Der Überstand wurde verworfen und die Reaktionsgefäße zum Trocknen des Protein-Pellets 30 min kopfüber auf Zellstoff gestellt. Anschließend wurden die Pellets in 250 µl 0,2 M NaOH mit Hilfe eines Kleinschüttlers (Vortex-Genie 2, Roth, Karlsruhe, Deutschland) resuspendiert. Nach Lösen der Proteinpellets erfolgte die Zugabe von 1,25 ml Biuret-Reagenz. Die Ansätze wurden erneut gemischt und 30 min lang bei 30 °C inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation für 10 min bei 14.000 rpm (Centrifuge 5402, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurde die Extinktion des Überstandes bei 546 nm in einer Küvette mit 10 mm Schichtdicke gegen Luft gemessen. Als Referenz diente ein Ansatz, der ausschließlich Puffer anstelle der Probe enthielt und gleichermaßen behandelt wurde.

Zur Berechnung der Proteinkonzentration wurde eine Eichgerade mit BSA-Proben erstellt. Aus einer BSA-Stammlösung (20 mg / ml in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2) wurde eine Verdünnungsreihe mit 0 - 20 mg / ml BSA erstellt und 100 µl der jeweiligen Verdünnungsstufe der Biuret-Reaktion unterzogen.

Biuret-Reagenz:

Na-K-Tartrat	0,9 g
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,3 g
Kaliumiodid	0,5 g
0,2 M NaOH	ad 100 ml

2.16.3 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Die Proteinkonzentration in löslichen Fraktionen konnte nach der Bradford-Methode (Bradford 1976) durchgeführt werden. Hierbei wurden in einem Reagenzglas 10 - 50 µg Protein mit 5 ml Bradford-Reagenz versetzt und gründlich gemischt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm in Küvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm bestimmt. Als Referenz dienten 100 µl Puffer, die gleichermaßen mit 5 ml Bradford-Reagenz versetzt und 5 min inkubiert wurden. Zur Berechnung der Proteinkonzentration in den Proben wurde unter identischen Bedingungen eine Eichgerade mit Rinderserumalbumin in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 aufgenommen. Hierbei wurden 0 - 50 µg Protein pro Ansatz eingesetzt.

Bradford-Reagenz:

Servablau G-250	100 mg
Ethanol (96%, v/v)	50 ml
Phosphorsäure (80%, v/v)	100 ml
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

2.17 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli (1970) wurde im diskontinuierlichen System als Plattenelektrophorese (Hoefer SE 600 Series, Pharmacia, Biotech, Freiburg, Deutschland) durchgeführt. Denaturierende Gele bestanden dabei aus einem Trenngel mit 12 % und einem Sammelgel mit 7,5 % Acrylamid/Bisacrylamid. Bei nicht-denaturierenden Gelen wurde auf das Sammelgel verzichtet.

Die Reagenzien zur Herstellung der Gele wurden in einem Becherglas unter ständiger Rührung zusammenpipettiert. Das Pipettierschema dazu ist in Tab. 2-10 aufgeführt. Nach Einfüllen der Lösung in die Gießapparatur wurde mit Isopropanol überschichtet, um einen geraden Abschluss zu erhalten und die eingefüllte Lösung zur besseren Polymerisation vor Sauerstoff zu schützen.

Tabelle 2-10: Pipettierschema für Polyacrylamidgele

	denaturierende Gele (SDS-PAGE)		nicht-denaturierende Gele (native PAGE)
	Trenngel 12%	Sammelgel 7,5 %	Trenngel 7,5%
Trenngelpuffer	18,0 ml	-	27,0 ml
Sammelgelpuffer	-	5,0 ml	-
H ₂ O _{bidest}	3,6 ml	2,45 ml	13,5 ml
Na ₂ SO ₃	50 mg	-	75 mg
Acrylamid/Bisacrylamid	14,4 ml	2,5 ml	13,5 ml
SDS (10% w/v)	360 µl	100 µl	-
Tetramethyldiamin (TEMED)	9 µl	5 µl	13,5 µl
Ammoniumperoxodisulfat (10 % w/v)	90 µl	50 µl	135 µl

Acrylamid/Bisacrylamid:

fertige Stammlösung (Rotiphorese Gel 30, Roth, Karlsruhe, Deutschland):

30 % (w/v) Acrylamid

0,8 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid

Trenngelpuffer:

0,89 M Tris/HCl, pH 8,8

Sammelgelpuffer:

0,32 M Tris/HCl, pH 6,8

Laufpuffer:

0,05 M Tris

0,384 M Glycin

0,1 % (w/v) SDS (nicht bei nativen Gelen)

Die Proben für die denaturierende PAGE wurden mit dem gleichen Volumen an Kochpuffer versetzt und gründlich gemischt. Anschließend wurden die Ansätze 4 - 10 min lang im Wasserbad oder Thermoheizblock (TB1, Whatman Biometra, Göttingen, Deutschland) gekocht.

Probenpuffer für SDS-PAGE:

SDS	1,0 g
β-Mercaptoethanol	2,5 ml
Glycerin (87%)	5,8 ml
Bromphenolblau	5,0 mg
0,325 M Tris	ad 35 ml

Proben für nicht-denaturierende Gele wurden mit einem Ladepuffer aus 0,25 % (w/v) Bromphenolblau und 45 % (w/v) Saccharose versetzt. Das Verhältnis Probe zu Ladepuffer betrug dabei 4:1.

Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 15 mA im Sammelgel und 30 mA im Trenngel. Die Elektrophorese wurde beendet sobald die Bromphenolblau-Front das untere Ende des Gels erreicht hatte.

Für denaturierende Gele, die anschließend geblottet wurden, diente der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) als Marker zur Größenbestimmung. Der Marker PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) wurde bei den denaturierenden Gelen eingesetzt, die zur Visualisierung der Proteinanden mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt wurden. Auf native Gele wurde als Marker „HMW Native Marker Kit“ (GE Healthcare, Großbritannien) aufgetragen.

Durch das Färben der Gele (denaturierend und nativ) mit Coomassie-Brilliant-Blau wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht. Die Gele wurden hierzu 1 h in Färbelösung und anschließend 4 h lang in Entfärbelösung unter leichtem Schütteln inkubiert.

Färbelösung:

50 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Essigsäure
0,1 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau R250

Entfärbelösung:

10 % (v/v) Methanol
7 % (v/v) Essigsäure

2.18 Western-Blotting

Die mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine konnten über eine Semidryblotting-Apparatur (Nova-Blot 2117 Multiphor II Electrophoresis Unit 250, LKB, Bromma, Schweden) auf eine Polyvinyliden-Difluorid-Membran (Roti-PVDF T830.1, 0,45 μm Porengröße; Roth, Karlsruhe, Deutschland) transferiert werden (Towbin et al. 1979). Sowohl die Polyvinyliden-Difluorid-Membran als auch 24 Chromatographiepapiere (Whatman, Maidstone, UK) wurden zunächst auf Gelgröße zugeschnitten (13,5 x 14 cm). Die PVDF-Membran wurde 15 sec in Methanol inkubiert, anschließend 2 min in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gewaschen und schließlich mindestens 5 min in Towbin-Puffer äquilibriert. Das Polyacrylamid-Gel und die Chromatographiepapiere wurden ebenfalls in Towbin-Puffer inkubiert. Der Aufbau des „Blotsandwich“ ist in Abb. 2-2 dargestellt. Oberhalb bzw. unterhalb der PVDF-Membran und des Gels befanden sich während des Blots jeweils 12 in Towbin-Puffer getränkte Chromatographiepapiere. Der Transfer erfolgte bei maximaler Spannung mit einer Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für 2 h.

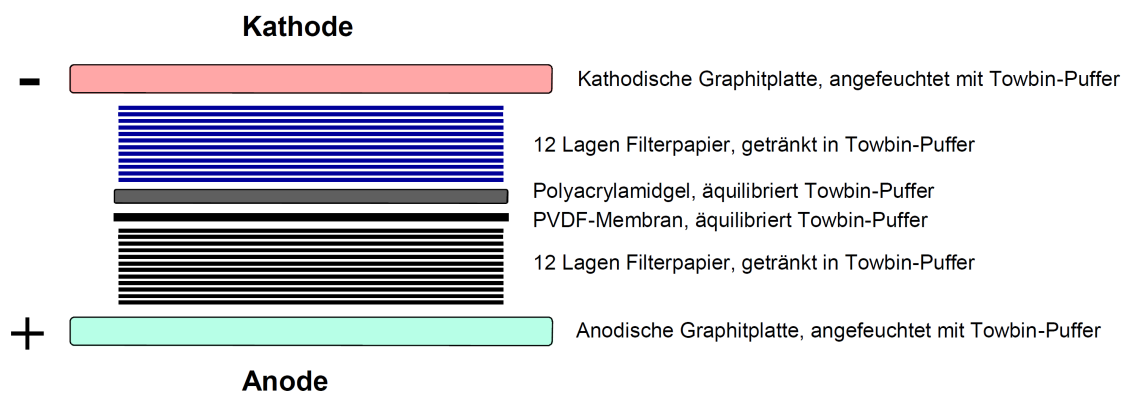


Abbildung 2-2: Aufbau des „Blotsandwich“ für den Transfer der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran.

Für den Transfer gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf eine Polyvinyliden-Difluorid-Membran, wurden zwischen der anodischen und kathodischen Graphitplatte Filterpapiere, die PVDF-Membran, das Polyacrylamidgel und erneut Filterpapiere übereinander geschichtet. Die Graphitplatten wurden zuvor mit Towbin-Puffer angefeuchtet, ebenso wurden die Filterpapiere in Towbin-Puffer getränkt. Die Membran wurde zur besseren Aufnahme von Proteinen in Methanol inkubiert, ehe sie nach kurzem Waschen in H_2O wie das Gel in Towbin-Puffer äquilibriert wurde. Die Stromstärke für den Transfer betrug $0,8 \text{ mA/cm}^2$.

10 x Towbin-Puffer, pH 8,6:

Tris	250 mM
Glycin	1,92 mM
SDS	3,5 mM
H ₂ O	ad 1000 ml

1 x Towbin-Puffer:

10 x Towbin-Puffer, pH 8,6	100 ml
Methanol	150 ml
H ₂ O _{dest}	750 ml

Nach dem Transfer konnte die Membran entweder an der Luft getrocknet oder eine reversible Färbung der Proteinbanden auf der PVDF-Membran mit Ponceau S durchgeführt werden. Dazu wurde die noch feuchte Membran 1 min in der Ponceau S - Färbelösung inkubiert und anschließend in mit HCl angesäuertem H₂O_{dest} ausgewaschen, bis Banden sichtbar wurden. Zum vollständigen Entfärben wurde die Membran unter leichtem Schütteln 30 min in 0,1 M NaOH inkubiert.

Ponceau S-Färbelösung:

- 2 % (w/v) Ponceau S
- 1 % Trichloressigsäure

2.19 Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz von CoxF

Durch N-terminale Sequenzierung sollte rekombinantes CoxF eindeutig identifiziert werden. Hierzu wurden sowohl Einschlusskörper von *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 als auch cytoplasmatische Fraktionen mit löslichem CoxF gelelektrophoretisch aufgetrennt und die CoxF-Gelbande aus den Polyacrylamidgelen isoliert. Um zu verhindern, dass die N-terminalen Aminosäuren durch reaktive Substanzen blockiert werden, wurden hochreine Chemikalien mit den Reinheitsgraden *pro analysis* und *electrophoresis grade* verwendet. Des Weiteren erfolgte die Polymerisation der Gele über Nacht und die Elektrophorese wurde in Gegenwart von 0,1 M Thioglycolsäure im Kathodenpuffer durchgeführt. Auf diese Weise sollte verhindert werden, dass freie Radikale aus dem Polymerisationsvorgang mit den

empfindlichen Aminosäureseitenketten reagieren (Hunkapiller et al. 1983; Matsudaira 1987). Für ein relativ hohes Protein-Gel-Verhältnis wurden pro Bahn 200 µg Protein aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die vermeintliche CoxF-Bande wurde ausgeschnitten, zerkleinert und ein weiteres mal gelelektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western-Blotting (Kap. 2.18) wurde das Protein anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert und dort mit Ponceau S angefärbt. Nach Trocknen an der Luft konnte die CoxF-Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und schließlich in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt werden. Die Sequenzbestimmung der ersten zehn N-terminalen Aminosäuren wurde von der Firma SEQLAB (Sequence Laboratories Göttingen GmbH, Göttingen, Deutschland) nach der Edmann-Methode (Hewick et al. 1981; Rodriguez et al. 1984) durchgeführt.

2.20 Produktion polyklonaler Immunoglobulin G - Antikörper gegen CoxF

Die Gewinnung polyklonaler IgG-Antikörper erfolgte in Zusammenarbeit mit der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien). Zwei Kaninchen wurden hierfür im Rahmen des sog. *Speedy*-Programmes mit dem CoxF-Antigen immunisiert.

Gewinnung der Antigene

Für die Produktion von IgG-Antikörpern wurde denaturiertes, rekombinantes CoxF-Antigen aus *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 verwendet, da kein homologes CoxF aus *O. carboxidovorans* OM5 zur Verfügung stand. Lösliches, rekombinantes CoxF aus *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 wird im Extrakt von einer Vielzahl weiterer, durchaus störender Proteine begleitet. Um möglichst reines CoxF für die Immunisierung zu erhalten, wurde daher heterologes CoxF in Form von Einschlusskörpern gewonnen (Kap. 2.14). Zur Entfernung möglicher Kontaminationen wurde eine zweimalige SDS-PAGE (Kap. 2.17) durchgeführt. 2 mg CoxF-Einschlusskörper (je 200 µg pro Bahn) wurden dabei eingesetzt und in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Mitführen eines Molekulargewichtstandards war eine Größenabschätzung möglich. Nach der ersten Elektrophorese wurden die Gele zunächst 45 min in 30 % (v/v) Methanol und anschließend 3 h im reversiblen Fluoreszenzfarbstoff Roti-Green (Roth, Karlsruhe, Deutschland) unter leichtem Schütteln inkubiert. Durch 2-3 - maliges Waschen in 30 % (v/v) Methanol für jeweils 30 min konnte ungebundener Farbstoff entfernt werden. Die gefärbten Proteinbanden

konnten danach auf einem Transilluminator (Macrovue 2011, LKB, Bromma, Schweden) bei einer Exzitationswellenlänge von 365 nm sichtbar gemacht werden. Durch Vergleich mit dem Molekulargewichtsstandard konnte in jeder Bahn eine dominierende Bande auf dem Gel ausgemacht werden, die in der Größe CoxF entsprach. Diese Banden wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und die Gelfragmente in 100 mM K_2HPO_4 mit 50 mM Na_2-EDTA für 30 min unter leichtem Schütteln entfärbt. Jede Gelbande wurde in 100 μ l 250 mM Tris/HCl, pH 6,7 mit 1 % (w/v) SDS zermörsert und 16 h bei 30 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Elution des Proteins aus der Gelmasse erfolgte mittels Gelextraktionskits (Ultrafree-DA, Roth, Karlsruhe, Deutschland) durch Zentrifugation bei 5.000 x g für 10 min. Das so gewonnene Eluat hatte ein Volumen von etwa 100 μ l und wurde einer weiteren SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unterzogen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte die Anfärbung mit Roti-Green, die Entfärbung und Elution wie bereits oben beschrieben. Die hieraus gewonnenen Eluate hatten ein Volumen von ca. 100 μ l mit 100 - 150 μ g Protein, wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei -80 °C eingefroren und auf Trockeneis versandt. Die Immunisierung zweier Kaninchen gegen CoxF erfolgte bei der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien). Zum Einsatz kam das sog. 28-Days-Speedy-Programm. Zu Beginn dieses Programmes („Tag 0“) wurde den Kaninchen das CoxF-Antigen subkutan injiziert. Um den Antikörpertiter gegen CoxF und die Spezifität weiter zu erhöhen wurde nach 7, 10 und 18 Tagen eine erneute Immunisierung durchgeführt. Am Tag 21 wurde den Tieren 10 ml Blut abgenommen und am Tag 28 nach Immunisierung wurden die Kaninchen vollständig ausgeblutet. Auf diese Weise konnten Seren mit einem Volumen von ca. 50 ml erhalten werden. Im gekoppelten immunologischen Test (Kap. 2.22) wurde schließlich die Spezifität der Seren überprüft.

2.21 Anreicherung von IgG - Antikörpern an Protein A

Für die Detektion von Proteinen über das gekoppelte immunologische Nachweissystem (Kap. 2.22) sind nur Immunglobulin G-Antikörper von Bedeutung. Daher wurde dieser Antikörper-Typ durch Affinitätschromatographie an Protein A aus den Kaninchenseren angereichert.

Da Kaninchen gerade in der Käfighaltung mit ihrer Nahrung auch viele ubiquitär vorkommende Mikroorganismen wie *E. coli* aufnehmen, z.B. durch Kontamination des Futters mit Exkrementen, kann es durchaus schon vor der eigentlichen Immunisierung zu

einer Immunantwort gegen *E. coli* kommen (Proteomics - Technical Guide, Eurogentec; <http://www.eurogentec.com/EGT/Files/Proteomic/Proteomics-Technical-Guide.pdf>). Daher war es wichtig, vor der Anreicherung der IgG-Antikörper deren Spezifität sicherzustellen, damit beim immunologischen Nachweis von CoxF (Kap. 3.3 und 3.4) in Extrakten von *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 keine unspezifischen Signale erhalten werden. Zur Absättigung der Paratope aller gegen *E. coli* gebildeten IgG-Antikörper wurden die Immunsereen im Verhältnis 1 : 4 mit zellfreiem Rohextrakt nicht induzierter *E. coli*-Zellen versetzt und 24 h unter leichtem Schütteln inkubiert. Unlösliche Bestandteile und entstandene Immunpräzipitate wurden abzentrifugiert (14.000 x g, 30 min, 4 °C) und die Überstände schließlich an einer HiTrap rProtein A FF-Säule (5 ml Säulenvolumen, Bindekapazität 10 - 50 mg IgG ml⁻¹; GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) aufgereinigt. Die Flussrate betrug 1,5 ml/min. Zunächst wurde die Säule mit 25 ml H₂O_{dest} gespült, danach mit 50 ml Bindepuffer äquilibriert. Schließlich wurden 6 ml Immunsereum mit einer Konzentration von ca. 50 mg/ml aufgetragen und nicht-bindende Komponenten mit 50 ml Bindepuffer entfernt. Die gebundene IgG-Fraktion wurde mit 50 ml Elutionspuffer eluiert. Während des gesamten Laufs der Affinitätschromatographie wurden Fraktionen zu je 3 ml gesammelt und ein Proteinprofil durch Messung der Extinktion bei 280 nm aufgenommen.

Bindepuffer:

20 mM Natriumphosphat
pH 7,0 (eingestellt mit 85 %-iger Phosphorsäure)

Elutionspuffer:

100 mM Natriumcitrat
pH 4,0 (eingestellt mit 25 % (v/v) Citronensäure)

Mittels eines gekoppelten immunologischen Nachweises konnten diejenigen Fraktionen, die die spezifischen Anti-CoxF-IgGs enthielten, identifiziert werden. Rekombinantes CoxF aus Einschlusskörpern von *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 mit einer Konzentration von 10 mg/ml wurde durch 5 min Kochen in 2 % (w/v) SDS gelöst und 20-fach mit 20 mM Tris/HCl, pH 8,0 verdünnt. Durch Verwendung einer Slot-Blot-Apparatur wurde das Protein auf einer PVDF-Membran fixiert. Um die Bindekapazität der Membran zu erhöhen, wurde diese zunächst 15 sec in Methanol inkubiert und anschließend 2 min in H₂O_{dest} gewaschen. Die Membran wurde anschließend auf zwei mit H₂O_{dest} getränkte Filterpapiere platziert und in die Slot-Blot-

Apparatur eingespannt. Pro Slot wurde ein Volumen von 100 µl mit 50 µg Protein appliziert und durch Anlegen eines Vakuums von 0,8 bar für 10 min angesaugt. Nicht-fixiertes Protein konnte durch Spülen mit H₂O_{dest} entfernt werden. In die Slots wurden anschließend 100 µl der jeweiligen Fraktionen der Affinitätschromatographie pipettiert. Nach Inkubation des Blots für 2 h bei Raumtemperatur wurden ungebundene IgG-Antikörper durch erneutes Spülen mit H₂O_{dest} entfernt. Die Slot-Blot-Apparatur wurde danach auseinandergebaut, die Membran herausgenommen und diese in AP-T-Puffer gewaschen. Anschließend wurde mit sekundärem Antikörper (Anti-Rabbit-IgG mit konjugierter alkalischer Phosphatase; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) inkubiert und die Membran nach erneutem Waschen in AP-Puffer äquilibriert. Die Färbereaktion erfolgte wie unter Kap. 2.22 beschrieben. Die angefärbte Membran konnte danach eingescannt und densitometrisch ausgewertet werden (Kap. 2.23). Diejenigen Fraktionen, die spezifische Anti-CoxF-IgGs enthielten, wurden vereinigt und mittels Gelfiltration an einer PD-10 Säule (Sephadex G-25; GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien) in 20 mM Tris/HCl pH 7,4 umgepuffert. Mittels Ultrafiltration an einer Membran mit 10 kDa Ausschlussgrenze (Vivaspin II - Konzentratoren, Sartorius, Göttingen, Deutschland) konnte die Lösung zur gewünschten Konzentration aufkonzentriert werden.

2.22 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Die immunologische Detektion von Proteinen mittels spezifischer Antikörper erfolgte nach Towbin et al. (1979). Die PVDF-Membran (nach Western-Blot) wurde zunächst 2 h in AP-T-Puffer unter leichtem Schütteln inkubiert, um überschüssige Bindestellen auf der Membran abzusättigen. Anschließend wurde der Puffer abgegossen und der primäre Antikörper zugegeben. 10 µg Antikörper in 100 ml AP-T-Puffer wurden eingesetzt. Bei den Antikörpern handelte es sich um Anti-CoxD/E/F-IgGs oder Anti-CO-Dehydrogenase-IgGs. Nach 2 h Inkubation unter leichtem Schütteln wurde die Antikörper-haltige Lösung abgegossen und die PVDF-Membran viermal für je 5 min mit AP-T-Puffer gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Im Anschluss folgte die Zugabe des sekundären Antikörpers. 3 µl Anti-Rabbit-IgG mit konjugierter alkalischer Phosphatase (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in 100 ml AP-T-Puffer wurden eingesetzt und die Membran in dieser Lösung unter leichtem Schütteln 1 h inkubiert. Die PVDF-Membran wurde anschließend erneut viermal für je 5 min unter leichtem Schütteln in AP-T-Puffer gewaschen und danach in AP-Puffer für 5 min äquilibriert. Zur Durchführung der Färbereaktion wurde die Membran anschließend in die

Substrat-Lösung gelegt bis violett gefärbte Banden sichtbar wurden. Die Farbreaktion wurde in mit HCl angesäuerten $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ abgestoppt und die Membran auf Filterpapier getrocknet.

AP-T-Puffer:

Tris	0,1 M
NaCl	0,1 M
$\text{MgCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$	5 mM
0,05 % (v/v) Tween 20	
pH mit HCl ad 7,4	

AP-Puffer:

Tris	0,1 M
NaCl	0,1 M
MgCl_2	5 mM
pH mit HCl ad 9,5	

Substrat-Lösung:

p-Nitroblau Tetrazolium Chlorid (NBT)-Lösung:

Dimethylformamid	630 μl
AP-Puffer (pH 9,5)	400 μl
p-Nitroblau Tetrazolium Chlorid (75 mg/ml)	68 mg

5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat Dinatrium Salz (BCIP)-Lösung:

Dimethylformamid (70 %, v/v)	524 μl
AP-Puffer (pH 9,5)	2000 μl
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat Dinatrium Salz (50 mg/ml)	38 mg

in 120 ml AP-Puffer, pH 9,5

2.23 Videodensitometrische Auswertung von denaturierenden und nativen Polyacrylamid-Gelen und immunologisch gefärbten Western-Blots

Die videodensitometrische Auswertung von Polyacrylamid-Gelen und PVDF-Membranen nach Immunoblot erfolgte mit der frei zugänglichen Software ImageJ (National Institutes of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>; ImageJ 1,43u Wayne Rasband). Dabei wurden die stöchiometrischen Anteile der jeweiligen Proteinbanden durch die Integration einzelner Peakflächen des densitometrischen Scans ermittelt.

2.24 Assays zur Bestimmung von Enzym-Aktivitäten

2.24.1 CO-oxidierende Aktivität von CO-Dehydrogenase

Aktivitätsfärbung auf nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gelen

Die CO-oxidierende Aktivität von CO-Dehydrogenase Banden auf nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gelen konnte durch die Reduktion von INT (2-(4-Iodphenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2*H*-tetrazoliumchlorid) zu Formazan visualisiert werden (Kraut et al. 1989). Die Reaktion ist mit der Oxidation von CO zu CO₂ über den intermediären Elektronenüberträger MPMS (1-Methoxyphenazin-5-methosulfat) gekoppelt. Die Färbelösung wurde in einer Glasflasche mit Schraubdeckel und Septum angesetzt und 30 min mit 100 % CO begast. Anschließend wurde das native Gel in einer fest verschließbaren Schale mit dem Testmix übergossen. Nach einer kurzen Inkubationszeit von wenigen Minuten unter leichtem Schütteln wurde die CO-Dehydrogenase-Aktivität als rote Bande sichtbar (Reduktion von INT zu Formazan (1-(4-Jodphenyl)-3-phenyl-5-(4-nitrophenyl)-formazan)).

Färbelösung „Testmix“:

9,9 mM INT	2,5 ml
8,9 mM MPMS	0,5 ml
50 mM KH ₂ PO ₄ /NaOH, pH 7,2	ad 200 ml

Photometrische Bestimmung der CO-oxidierenden Aktivität

Die CO-oxidierende Aktivität von CO-Dehydrogenase (Wildtyp und Mutanten) konnte photometrisch durch Verfolgen der Formazanbildung bei 496 nm ermittelt werden. Küvetten mit Rundbohrungen und Teflonstopfen wurden mit 1 ml Testmix versetzt und in einem Wasserbad bei 30 °C temperiert. Anschließend wurden 1 - 10 µl Enzymlösung zum Testmix hinzupipettiert und die Blindreaktion an einem Spektralphotometer (Novaspec II, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) mit angeschlossenen Schreiber (L6512, Linseis, Selb, Deutschland) verfolgt. Die eigentliche Reaktion wurde durch die Zugabe von 200 µl CO-gesättigtem 50 mM KH₂PO₄/NaOH pH 7,2 gestartet. Das CO in diesem Puffer dient der CO-Dehydrogenase dabei als Substrat. Im Zuge der Bildung von CO₂ werden Elektronen freigesetzt, welche über den intermediären Elektronenüberträger MPMS (1-Methoxyphenazin-5-methosulfat) auf INT (2-(4-Jodphenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazoliumchlorid) übertragen werden. INT wird zu Formazan reduziert, dessen Bildung durch die Extinktionszunahme bei 496 nm ($\epsilon = 17,98 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) verfolgt werden kann.

Testmix:

9,9 mM INT	250 µl
8,9 mM MPMS	50 µl
25 % (w/v) Triton X-100	500 µl
50 mM KH ₂ PO ₄ /NaOH, pH 7,2	ad 20 ml

Die spezifische CO-oxidierende Aktivität konnte aus der gemessenen Extinktionszunahme nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Spezifische Aktivität (U/mg)} = \frac{\Delta A_{496} \cdot V_{\text{gesamt}}}{V_{\text{Probe}} \cdot c \cdot d \cdot \epsilon} \quad (5)$$

$\Delta A_{496} \text{ (min}^{-1}\text{)}$: Absorptionszunahme bei 496 nm pro Minute

$V_{\text{gesamt}} \text{ (µl)}$: Gesamtvolumen des Ansatzes

$V_{\text{Probe}} \text{ (µl)}$: Volumen der Proteinlösung

$c \text{ (mg/ml)}$: Konzentration der Proteinlösung

$d \text{ (cm)}$: Schichtdicke der Küvette

$\epsilon \text{ (Formazan)}$: $17,98 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Unit (U): 1 µmol umgesetztes Substrat / gebildetes Produkt pro Minute

2.24.2 Malat- und NADH-Dehydrogenase-Aktivität

In subzellulären Fraktionen als auch in Fraktionen von Saccharosedichtegradienten können Malat-Dehydrogenase und NADH-Dehydrogenase als „Marker“ für lösliches bzw. partikuläres Protein herangezogen werden. Die Bestimmung beider Aktivitäten erfolgte photometrisch über die Oxidation von NADH (Bergmeyer 1974).

Dem entsprechenden Testansatz wurde in Quarzglas-Küvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm (Hellma, Mühlheim, Deutschland) 20 - 50 µl Probe zugegeben und die Oxidationsreaktion gestartet. Die Oxidation von NADH konnte durch Messen der Extinktionsabnahme bei 340 nm ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) photometrisch (Novaspec II, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) verfolgt und mittels eines angeschlossenen Schreibers (L200E, Linseis, Selb, Deutschland) dokumentiert werden.

Testansatz Malat-Dehydrogenase:

50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$, pH 7,5	970 µl
6 mM NADH (in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$, pH 7,5)	20 µl
100 mM Oxalacetat in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$	10 ml

Testansatz NADH-Dehydrogenase:

50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$, pH 7,5	980 µl
6 mM NADH (in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$, pH 7,5)	20 µl

2.24.3 Aktivität saurer Phosphatasen

Der Assay zur Bestimmung der Aktivität saurer Phosphatasen erfolgte modifiziert nach Hillmann (1971). Dabei wird bei einem (leicht) sauren pH-Wert von 6,5 1-Naphthylphosphat enzymatisch zu 1-Naphthol und Phosphat hydrolysiert. Ersteres reagiert zügig mit Fast Red TR, einem stabilisierten Diazoniumsalz (diazotiertes 2-Amino-5-chlortoluol), welches dem Testansatz zugegeben wird. Im Zuge dieser Reaktion kommt es zur Bildung eines roten Farbstoffes, welche kontinuierlich durch Messung der Extinktion bei 410 nm verfolgt werden kann. Durch Substratzugabe wird die Reaktion gestartet und führt zu einer schnellen Farbstoffbildung durch die Reaktion mit freiem 1-Naphthol. Nach ca. 1 min kann ein linearer Anstieg der Extinktion beobachtet werden.

Die im Assay gewählten Bedingungen stellen einen Kompromiss zwischen den Anforderungen der enzymatischen und chromogenen Reaktion dar. So liegt der pH-Wert des verwendeten Puffersystems mit 6,5 über den üblichen Aktivitätsmaxima saurer Phosphatasen. Der Vorteil des verwendeten pH-Wertes liegt allerdings darin, dass eine schnellere Reaktion zwischen 1-Naphthol und Fast Red TR ermöglicht wird.

Die Substratkonzentration von 3 mmol/L erlaubt 90 % der maximalen theoretischen Reaktionsgeschwindigkeit. Höhere Konzentration würden aufgrund des freien 1-Naphthols zu einem verzögerten Eintreten der linearen Phase führen und würden zudem die benötigte Konzentration an Tartrat erhöhen, um Tartrat sensitive saure Phosphatasen zu hemmen. Die im Assay eingesetzte Tartrat-Konzentration inhibiert sensitive saure Phosphatasen zu 95 %. Zur Erhöhung der Löslichkeit des gebildeten Farbstoffes wird dem Ansatz Triton X-100 zugesetzt. Das gebildete Chromophor besitzt ein Absorptionsmaximum zwischen 390 und 420 nm. 1-Naphthylphosphat-Orthophosphat enthält häufig Spuren freien 1-Naphthols, welches direkt mit dem Fast Red TR Diazoniumsalz reagieren und somit zu einem ungewollten Anstieg der Extinktion bei 410 nm führen würde. Aus diesem Grund wurde kommerziell erhältliches 1-Naphthyl Dinatriumsalz in einem Büchner-Trichter dreimal mit Diethylether gewaschen und somit freies 1-Naphthol entfernt.

Citratpuffer:

50 mM Trinatrium-Citrat Dihydrat in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$, pH 6,5 (mit HCl eingestellt)

Tartrat-Lösung:

1 M L-(+)-Weinsäure in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$, pH 6,5 (mit NaOH eingestellt)

Substrat-Lösung:

37,5 mM 1-Naphthylphosphat Dinatriumsalz in Citratpuffer

Fast Red TR-Lösung:

10 mg Fast Red TR (diazotiertes 2-Amino-5-chlortoluol)

20 mg Triton X-100

in 25 ml Citratpuffer

In Quarzglas-Küvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm (Hellma, Mühlheim, Deutschland) wurde zunächst 1,0 ml Fast Red TR-Lösung vorgelegt. Für Aktivitätsmessungen Tartrat-

resistenter Phosphatasen wurden 50 µl Tartrat-Lösung zupipettiert. Anschließend wurde die Probe mit einem Volumen von 150 - 200 µl zugegeben, der Ansatz gründlich gemischt und mindestens 20 min bei 37 °C im Thermoblock (Typ DB-10C, Grant-bio, Cambridge, Großbritannien) inkubiert. Durch Zugabe von 200 µl Substratlösung wurde dann die Reaktion gestartet. Der Ansatz wurde gründlich gemischt und der lineare Anstieg der Extinktion bei 410 nm photometrisch (Novaspec II, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) verfolgt und mittels eines angeschlossenen Schreibers (L200E, Linseis, Selb, Deutschland) dokumentiert.

Tabelle 2-11: Pipettierschema zur Aktivitätsbestimmung saurer Phosphatasen, modifiziert nach Hillmann (1971)

Lösung	Gesamtaktivität	Tartrat-resistente-Aktivität	Konzentration im Küvettenansatz
Fast Red TR-Lösung	1,0 ml	1,0 ml	Citrat 44 mM
Tartrat-Lösung	---	50 µl	Fast Red TR 0,8 mM
Probe	150-200 µl	150-200µl	Weinsäure 39 mM
mischen, Inkubation 20 min bei 37 °C			1-Naphthylphosphat 3 mM
Substrat-Lösung	100 µl	100 µl	
Mischen, Messen der Extinktion bei 410 nm, Aufnahme der Steigung 1 min nach Start der Reaktion			

Die Berechnung der Aktivität erfolgt über den Extinktionskoeffizienten des gebildeten Diazoniumsalzes bei 410 nm ($\epsilon = 1,56 \text{ L mmol}^{-1} \text{ mm}^{-1}$) und die eingesetzte Proteinkonzentration. Unit (U): 1 µmol umgesetztes Substrat / gebildetes Produkt pro Minute.

2.25 Ultrazentrifugation im Saccharosedichtgradienten

2.25.1 Fraktionierung im diskontinuierlichen Dichtegradienten

Mittels diskontinuierlicher Saccharose-Gradienten wurden Extrakte gemäß ihrer Dichte aufgetrennt. 10 - 80%-ige Saccharoselösungen (im entsprechenden Puffer) wurden beginnend mit dem höchsten Saccharosegehalt mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (Peristaltic Pump P-1, Pharmacia, Freiburg, Deutschland) in Zentrifugenröhrchen (50 ml Fassungsvermögen,

Polycarbonat; Herolab, Wiesloch, Deutschland) übereinander geschichtet. Durch eine geringe Flußrate von 1,0 ml/min konnte eine ungewollte Vermischung der Saccharose-Lösungen verhindert werden. Eine anschließende Lagerung für 24 h bei 4 °C führte zur Linearisierung der Stufengradienten. Die Probe wurde auf die oberste Schicht des Gradienten aufgetragen. Das Volumen betrug maximal 5 % des Gesamtvolumens des Gradienten. Zur Überprüfung von Linearität und Trennqualität wurde ein unter identischen Bedingungen hergestellter Gradient, der anstelle einer Probe mit Puffer beladen wurde, als Referenz mitgeführt. Die Zentrifugenröhrchen wurden für 42 h bei 4 °C und 100.000 x g ultrazentrifugiert (Rotor TI-50 / TFT 45.94, Centrikon T-1045, Kontron, Eching, Deutschland). Nach erfolgter Ultrazentrifugation wurde in die Röhrchen eine Kanüle bis zum Becherboden eingeführt und die Gradienten mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe abgepumpt (1,0 ml/min) und fraktioniert (1,0 - 2,0 ml). Mittels einer zuvor erstellen Eichkurve wurde die Saccharose-Konzentration in den Fraktionen refraktometrisch (Refraktometer, Zeiss, Jena, Deutschland) über ihre Brechungsindizes ermittelt.

2.25.2 Ultrazentrifugation im linearen Saccharosedichtegradienten zur Bestimmung von Molekulargewichten

Die Zentrifugation im linearen Saccharosedichtegradienten konnte zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen herangezogen werden (Martin und Ames 1961). Referenzproteine mit bekannten Molekulargewichten und bekannten Sedimentationskoeffizienten ($S_{20,w}$) wurden hierzu auf einen unter identischen Bedingungen geformten Gradienten aufgetragen und ultrazentrifugiert. Der Referenzgradient wurde in analoger Weise fraktioniert und vermessen. Die Verteilung von Zielprotein bzw. Referenzprotein über den Gradienten wurde durch eine geeignete Methode der Proteinbestimmung (Kap. 2.16) ermittelt. Anschließend konnte das Molekulargewicht des Zielproteins nach Schachmann (1959) berechnet werden. Die Sedimentationskonstante des Zielproteins errechnet sich nach Gleichung 6. Für die Wanderungsstrecke wurde die jeweilige Saccharose-Konzentration derjenigen Fraktion eingesetzt, in welcher das Protein nachgewiesen werden konnte.

$$\frac{\text{Wanderstrecke Referenzprotein}}{\text{Wanderstrecke Zielprotein}} = \frac{S_{20,w} \text{ Referenzprotein}}{S_{20,w} \text{ Zielprotein}} \quad (6)$$

Das Molekulargewicht des Zielproteins kann durch Einsetzen der bekannten Sedimentationskoeffizienten und des Molekulargewichts des Referenzproteins in Gleichung 7 berechnet werden:

$$\frac{S_{20,w} \text{ Referenzprotein}}{S_{20,w} \text{ Zielprotein}} = \left(\frac{\text{MW Referenzprotein}}{\text{MW Zielprotein}} \right)^{\frac{2}{3}} \quad (7)$$

2.26 Spektroskopische Methoden

2.26.1 Aufnahme von UV/VIS-Absorptionsspektren und Bestimmung der katalytischen Funktionalität

UV/VIS-Absorptionsspektren von Lösungen aufgereinigter Proteine wurden an einem Zweistrahl-Spektralphotometer (BioMate 6, Thermo Scientific, Bonn, Deutschland) aufgenommen. Die Messgeschwindigkeit betrug 1.200 nm/min, die Spaltbreite 2,0 nm. Messungen erfolgten in einem Wellenlängenbereich von 200 bis 850 nm in Spezialglas- oder Quarzküvetten (Schichtdicke $d = 1$ cm) gegen eine entsprechende Pufferlösung als Referenz. Spektren von aufgereinigter CO-Dehydrogenase wurden in Quarzküvetten mit Schraubverschluss und Septum gegen 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 aufgenommen. Hierzu wurde die Proteinlösung auf eine Konzentration von 1,2 bis 1,5 mg/ml mit dem entsprechenden Puffer verdünnt. Die Probe wurde sowohl im Luft-oxidierten Zustand gemessen als auch nach Reduktion mit CO oder Na-Dithionit. Für CO-reduzierte Spektren wurde die Proteinlösung in der Küvette 30 min lang bei Raumtemperatur mit 100 % CO durchspült. Dithionit-reduzierte Proben konnten erhalten werden, indem 300 μ M Dithionit kristallin zu der Enzym-Probe gegeben wurden. Nach 5 min Inkubation wurde dieses abzentrifugiert und ein Spektrum des Überstandes aufgenommen.

Zur Berechnung der katalytischen Funktionalität des Enzyms wurde das Maß der Reduktion des FAD-Kofaktors durch CO zur Reduktion mit Dithionit ins Verhältnis gesetzt. CO reduziert dabei nur den funktionellen Enzym-Anteil, während Dithionit sowohl funktionelles als auch nicht-funktionelles Enzym gleichermaßen reduziert (Dobbek et al. 2002).

2.26.2 Elektronspinresonanz-Spektroskopie (ESR)

Elektronspinresonanz-Spektren wurden an einem Bruker EMX-ESR-Spektrometer (Bruker, Karlsruhe, Deutschland) aufgenommen. Die Mikrowellenfrequenz betrug dabei 9,470 GHz (X-Band) mit einer Modulationsfrequenz von 100 kHz, einer Modulationsamplitude von 1 mT und einer Mikrowellenleistung von 10 mW. Mit einem Helium-Kryostaten (ESR 900 Cryostat, Oxford Instruments, England) und einer Temperatur-Kontrolleinheit (ITC503, Oxford Instruments, England) konnte der Probenkopf auf Temperaturen von 6 bis 120 K temperiert werden. Jede Probe wurde sechsmal gemessen und die erhaltenen ESR-Spektren jeweils gemittelt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Win-EPR (Bruker, Karlsruhe, Deutschland). Zur Bestimmung der Mikrowellenfrequenz wurde ein Mikrowellenzähler verwendet, die Kalibrierung des Magnetfeldes erfolgte mit einer Diphenylpicrylhydrazin-Referenz-Probe.

Berechnung der g -Faktoren (nach Palmer 1985):

$$g = \frac{71,4484 \cdot \nu}{(B_0 + 0,267)} \quad (8)$$

mit B_0 Magnetfeld in mT
 ν Mikrowellenfrequenz in GHz

Proteinproben von CO-Dehydrogenase (Wildtyp und Mutante, 12 mg/ml) in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 wurden Luft-oxidiert oder reduziert gemessen. Die Reduktion erfolgte dabei entweder mit CO oder Dithionit. Vor der Messung wurden die Proben (250 μ l) in einem luftdicht-verschlossenen Klarglasgefäß entgast und mit Stickstoff begast. Unter Stickstoffatmosphäre wurden die Proben anschließend in ESR-Röhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und darin bis zur Messung aufbewahrt.

CO-reduzierte Proben konnten hergestellt werden, indem das anoxische Enzym 30 min mit 100 % CO durchspült wurde. Für die Herstellung Dithionit-reduzierter Proben wurde zum anoxischem Enzym Dithionit-Lösung (Stickstoff-begaste, anaerobe Stammlösung, 100 mM) in einer Endkonzentration von 5 mM zugegeben und die Probe danach in ESR-Röhrchen überführt und eingefroren.

2.26.3 Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie

Die Circular dichroismus-Spektroskopie zählt zu den chiroptischen Methoden und kann je nach eingesetztem Wellenlängenbereich dazu verwendet werden, den Gehalt an Sekundärstruktur-Elementen von Peptiden und Proteinen zu ermitteln (180 - 250 nm), Aussagen über die Tertiärstruktur von Proteinen treffen zu können (250 - 340 nm) oder Informationen zur Struktur von DNA und RNA zu erlangen (180 - 320 nm). Der Circular dichroismus ist dabei eine Eigenschaft chiraler, also optisch aktiver Moleküle. Die entsprechenden Enantiomere absorbieren das eingesetzte polarisierte Licht dabei unterschiedlich stark. Werden verschiedene Wellenlängen eingesetzt, so kann über die Absorptionsdifferenz ein entsprechendes CD-Spektrum erhalten werden.

Nach Rückfaltung von rekombinatem CoxF-Protein aus Einschlusskörpern (Kap. 2.14.1) wurde über Circular dichroismus-Spektroskopie der Gehalt an Sekundärstruktur-Elementen ermittelt. Die Messungen wurden am Lehrstuhl für Biopolymere der Universität Bayreuth (Universitätsstraße 30, 95447 Bayreuth, Deutschland) in Zusammenarbeit mit Dr. Stephan Schwarzingen durchgeführt. Die Spektren wurden an einem Spektropolarimeter (Jasco J-810, Jasco Germany, Groß-Umstadt, Deutschland) aufgenommen, welches über einen Jasco CDF-426S Peltier-Thermostaten verfügte. Vor der eigentlichen Messung wurden die CoxF-Proteinlösungen zunächst mittels Gelfiltration an einer PD-10 Säule (Sephadex G-25; GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien) in 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ pH 8,0 umgepuffert und dreimal dialysiert. Anschließend wurden die Proteinlösungen durch Anlegen eines Vakuums mehrfach entgast. Die Aufnahme der Spektren erfolgte im Fern-UV-Bereich von 176 nm bis 260 nm und wurde in temperierbaren Quarzküvetten (Hellma Analytics, Mühlheim, Deutschland) mit einer Schichtdicke von 10 mm bei einer Temperatur von 20 °C durchgeführt.

Parameter der CD-Messung:

Bandbreite	1 nm
Aufnahmegeschwindigkeit	20 nm/min
Auflösung	0,2 nm
Integrationszeit	2 sec

Die Empfindlichkeit im Fern-UV-Bereich wurde auf 20 mgrad eingestellt. Als Referenz wurden Spektren des verwendeten Probenpuffers 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ pH 8,0 aufgenommen und von den eigentlichen Spektren der Proteinproben abgezogen.

Mittels des Savitzky-Golay-Algorithmus (Savitzky und Golay 1964) wurden die Spektren bei einem Datenfenster von 17 Werten geglättet und in die mittlere, molare Elliptizität pro Aminosäure (Θ_{MRW}) umgerechnet.

$$\Theta_{\text{MRW}} = \frac{\Theta \cdot 100}{c \cdot d \cdot N_{\text{aa}}} \quad (9)$$

Θ_{MRW} mittlere, molare Elliptizität pro Aminosäure in $\text{Grad cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$

Θ gemessene Elliptizität in Grad

c Proteinkonzentration in mol/l

d Schichtdicke der Küvette in cm

N_{aa} Anzahl der Aminosäure-Reste im Protein

2.27 Elementanalysen im quantitativen Maßstab

2.27.1 Chemische Analysen

Molybdän

Die Bestimmung von Molybdän erfolgte nach der Dithiol-Methode (Cardenas und Mortenson 1974). Hierbei kommt es zur Bildung eines gelb-grünen Mo(VI)-Dithiol-Komplexes in saurer Lösung.

Dithiolreagenz:

Toluol-3,4-dithiol 1 g

1 % (w/v) NaOH 500 ml

Aufgrund seiner Empfindlichkeit gegenüber Oxidationsprozessen wurde das Dithiolreagenz mit Thioglycolsäure (Mercaptoessigsäure) bis zum Auftreten einer Opalfärbung titriert und bei 4 °C aufbewahrt.

In einem Reagenzglas wurde 1 ml Proteinlösung (1,5 - 2 mg) mit 1 ml H_2SO_4 (96 % v/v) vermischt und im Thermoblock für 60 min bei 250 °C inkubiert. Durch Zugabe weniger Tropfen H_2O_2 (30 % v/v) wurde der Ansatz entfärbt, überschüssiges H_2O_2 wurde durch Erhitzen verdampft. Nach Abkühlen der Ansätze wurden unter Eiskühlung 3 ml frisch filtrierte Dithiolreagenz hinzugegeben, der Ansatz gründlich gemischt und 30 min bei 20 °C inkubiert. Die nachfolgende Extraktion des gebildeten Mo(VI)-Dithiol-Komplexes erfolgte durch die Zugabe von 2 ml Isoamylacetat. Die Ansätze wurden 1,5 min lang gründlich gemischt und zur Phasentrennung schließlich 30 min bei 20 °C inkubiert. Die gelb-grüne organische Phase kann anschließend abgenommen und die Extinktion des Mo(VI)-Dithiol-Komplexes bei 600 nm gemessen werden. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurden Verdünnungen (5 - 50 μM) einer $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ Stammlösung mitgeführt und identisch behandelt. Die Mo-Bestimmung wurde jeweils als Dreifachbestimmung durchgeführt und der Mo-Gehalt schließlich gemittelt.

Cyanolysierbarer Schwefel

Die Bestimmung des cyanolysierbaren Schwefels erfolgte nach Westley (1981). Zunächst wurde eine anoxische 250 mM Kaliumcyanid-Lösung in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 hergestellt. 1 ml Enzym-Lösung (CO-Dehydrogenase, 1 - 3 mg/ml) wurde in einem Klarglasgefäß entgast, mit Stickstoff begast und mit der Kaliumcyanid-Lösung zu einer Endkonzentration von 5 mM versetzt. Der Ansatz wurde anschließend 20 h über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert (Dobbek et al. 2002). Im Zuge der Inkubation wurde SCN^- freigesetzt, welches durch Zentrifugation an einer Membran mit 10 - 30 kDa Ausschlussgrenze (Vivaspin II - Konzentratoren, Sartorius, Göttingen, Deutschland) als proteinfreies Eluat erhalten werden konnte. Durch die Zugabe von SÖRBOS-Reagenz kann schließlich das SCN^- als rot-braunes Eisenrhodanid $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ nachgewiesen werden. Hierzu wurden 0,3 bis 0,5 ml des Eluats mit dem gleichen Volumen an SÖRBOS-Reagenz versetzt, gründlich gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 460 nm (Maximum des gebildeten $\text{Fe}(\text{SCN})_3$) gemessen und hieraus der Gehalt des cyanolysierbaren Schwefels bestimmt. Als Referenz dienten 0,5 ml 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2, welche identisch behandelt wurden. Die Eichgerade wurde mit KSCN (0 - 20 μM in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2) aufgenommen.

SÖRBOS-Reagenz:

$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$	10 g
65 % HNO_3	20 ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$	ad 150 ml

Säurelabiler Schwefel

Die quantitative Bestimmung des säurelabilen Schwefels in Eisen-Schwefel-Zentren erfolgte nach Fogo und Popowsky (1949). Durch diese Analyse können letztendlich Rückschlüsse auf die Anzahl und Art der in einem Enzym vorhandenen Eisen-Schwefel-Zentren getroffen werden. Die verwendete Methode ist das sog. Methylenblau-Verfahren, welches deutlich sensitiver als z.B. die iodometrische Bestimmung ist. Der säurelabile Schwefel wurde (anders als in der Literatur beschrieben) nicht als gasförmiges H_2S in Lösung absorbiert, sondern im sauren Milieu in H_2S überführt. Als weitere Komponente wird Dimethylphenylendiamin zugegeben, welches durch Fe(III)-Ionen oxidiert wird und mit dem H_2S zu Methylenblau reagiert.

Folgende Lösungen wurden verwendet:

Zinkacetat-Lösung:

1,4 % (w/v) Na-Acetat x 3 H_2O
5,5 % (w/v) Zn-Acetat x 2 H_2O
in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

DMPD-Lösung:

0,1 % (w/v) N,N-Dimethyl-1,4-phenylendiamin-dihydrochlorid
in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

Eisen (III) – Lösung:

10 % (w/v) $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$
in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

700 µl Proteinlösung (CO-Dehydrogenase aus Wildtyp oder Mutante, Konzentration 0,5 - 1,5 mg/ml in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2) wurden mit 100 µl Zinkacetat-Lösung und 100 µl DMPD-Lösung versetzt und durch leichtes Schütteln gemischt. Anschließend wurden 100 µl Eisen (III) - Lösung zugegeben und der Ansatz 1 min lang gründlich gemischt. Nach 60 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben 15 min bei 16.000 x g zentrifugiert und die Extinktion des Überstandes bei 667 nm gemessen. Ein identisch-behandelter Ansatz ohne Protein wurde als Referenz mitgeführt.

Zur Quantifizierung des säurelabilen Schwefels in der CO-Dehydrogenase wurde eine Regressionsgerade mit dem Enzym Xanthinoxidase (Sigma-Aldrich) erstellt. Für dieses ist bekannt, dass es den säurelabilen Schwefel und das FAD im Verhältnis 4 : 1 enthält (Coughlan 1980; Meyer 1982). Die Bestimmung des FAD erfolgte wie unter Kap. 2.28 beschrieben. Die erhalten FAD-Werte wurden auf den Schwefelgehalt umgerechnet und zur Erstellung der Regressionsgeraden gegen die Extinktion bei 667 nm aufgetragen.

Chemische Bestimmung von Selen

Die Bestimmung von Selen in Präparaten von CO-Dehydrogenase erfolgte nach der Methode von Dye et al. (1987). 300 - 500 µl CO-Dehydrogenase mit einer Konzentration von 5 - 10 mg/ml in 50 mM HEPES/KOH pH 7,2 wurden in einem Reagenzglas mit 500 µl 65 % HNO_3 und einem Tropfen 35 % HCl versetzt und im Thermoblock bei 200 °C bis zur vollständigen Trockne verascht. Es wurden dabei Reagenzgläser verwendet, die bei Bedarf mit einem Schraubdeckel verschlossen werden konnten. Die eingedampfte Probe wurde anschließend in 2 ml 4 M HCl aufgenommen und im verschlossenen Reagenzglas 10 min im Wasserbad gekocht. Anschließend wurden 200 µl 2,5 M Ameisensäure, 1 ml 100 mM Na-EDTA und 200 µl einer 0,5 %-igen 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB) - Lösung hinzupipettiert. Nach Inkubation für 30 min im Dunkeln wurde der pH-Wert mit 3 M Ammoniak-Lösung auf 7,0 eingestellt und mittels Indikatorpapier überprüft. Die Ansätze wurden auf ein Volumen von 7 ml aufgefüllt und nach Zugabe von 2 ml Toluol ca. 1 min kräftig geschüttelt. Die organische Phase wurde abgenommen und die Fluoreszenz bei 425 nm Anregungswellenlänge und 565 nm Emission im Spektrofluorometer (Typ SFM 23; Tegimenta, Rotkreutz, Schweiz) gemessen. Als Referenz wurde anstelle der Probe ein identisches Volumen an 50 mM HEPES/KOH pH 7,2 mitgeführt und gleichermaßen behandelt. Zur Berechnung des Se-Gehalts wurde eine Eichgerade mit Na_2SeO_3 (2,5 - 30 µM) erstellt.

Chemische Bestimmung von Kupfer (I) - Ionen

Der Gehalt an Kupfer (I) wurde chemisch nach Brenner und Harris (1995) ermittelt und basiert auf der Bildung eines Cu(I)-BCA-Komplexes bei Reaktion von Kupfercyanat in Gegenwart von Bicinchoninsäure (BCA).

verwendete Reagentien:

Lösung A:	Trichloressigsäure	30 g
	H ₂ O _{dest}	100 ml
Lösung B:	L-Dihydroascorbinsäure	35,2 mg
	H ₂ O _{dest}	100 ml
Lösung C:	Na ₂ BCA x H ₂ O	6 mg
	NaOH	3,6 g
	HEPES	15,6 g
	H ₂ O _{dest}	90 ml

Zu Beginn wurde eine anoxische 250 mM Kaliumcyanid-Lösung in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 hergestellt. 1 ml Enzym-Lösung (CO-Dehydrogenase, mind. 2 - 3 mg/ml) wurde in einem Klarglasgefäß entgast, mit Stickstoff begast und mit der Kaliumcyanid-Lösung zu einer Endkonzentration von 5 mM versetzt. Der Ansatz wurde anschließend 20 h über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert (Dobbek et al. 2002). Während der 20-stündigen Inkubation wurde Kupfercyanat gebildet, welches durch Zentrifugation (25 min, 5.800 x g bei Raumtemperatur) an einer Membran mit 10 - 30 kDa Ausschlussgrenze (Vivaspin II - Konzentratoren, Sartorius, Göttingen, Deutschland) vom Protein abgetrennt werden konnte. Anschließend wurden 0,5 ml Eluat mit 0,5 ml Lösung A versetzt, der Ansatz gründlich gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Zugabe von Trichloressigsäure wurde dabei noch enthaltenes Protein gefällt, welches durch Zentrifugation abgetrennt werden konnte. 0,5 ml des Überstandes wurden nacheinander mit 0,1 ml frisch angesetzter Lösung B und 0,4 ml Lösung C versetzt und gründlich gemischt. Nach 2 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion beim 562 nm (Maximum des Cu(I)-BCA-Komplexes) gemessen. Als Referenz wurden 0,5 ml einer 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 gleichermaßen behandelt. Die Eichgerade wurde mit CuSO₄ (0 - 16 µM in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2) aufgenommen.

2.27.2 Bestimmung von Metallen mittels Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)

Die Messung des Gesamtgehaltes an Kupfer und Zink in aufgereinigten Proteinlösungen erfolgte an einem Perkin-Elmer 1100 B Atomabsorptionsspektrometer (Perkin-Elmer & Co. GmbH, Überlingen, Deutschland). Lösungen mit CO-Dehydrogenase (Wildtyp und Mutanten) wurden hierzu auf eine Endkonzentration von 3 - 5 mg/ml in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 verdünnt. Jede Messung erfolgte als Dreifach-Bestimmung mit einer Messzeit von jeweils 0,5 sec. Als Gase für die Flamme wurden Acetylen (2,5 ml/min) und Luft (8 ml/min) verwendet. Bei der Bestimmung des Kupfergehaltes betrug die Wellenlänge 324,7 nm, die Spaltbreite 0,7 nm und der Lampenstrom 10 mA. Zur Erstellung einer Eichgerade wurden Verdünnungen einer $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ bzw. $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ mit Endkonzentrationen von 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5 und 20 μM in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ hergestellt. Als Referenz diente 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2. Nach Messung der Eichlösungen berechnet das Gerät automatisch die entsprechende Regressionsgerade und gibt die Metallkonzentration der Probe in μM an.

2.27.3 Bestimmung von Metallgehalten über Neutronenaktivierungsanalyse (NAA)

Die Neutronenaktivierungsanalyse ist eine sensitive Multielement-Analyse-Technik, welche zur quantitativen Bestimmung von Spurenelementen und anderen selten-vorkommenden Elementen genutzt werden kann. Die Messungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Xiaosong Li an der Forschungs-Neutronenquelle Heinz Maier-Leibnitz (FRM II) der Technischen Universität München (Garching, Deutschland) durchgeführt.

Die Elemente Eisen (Fe), Molybdän (Mo), Kupfer (Cu) und Zink (Zn) sollten bestimmt werden. Die Proben der CO-Dehydrogenase (Wildtyp und Mutante) wurden im Vorfeld zweimal gegen 5 L 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 mit 1 mM EDTA dialysiert. Die weitere Probenvorbereitung erfolgte in speziellen PE Röhrchen. Jedes Röhrchen wurde mit 2 ml Proteinlösung mit einer Konzentration von 9,5 mg/ml befüllt. Volumen und Konzentration wurden dabei so gewählt, dass ein Metallgehalt von 5 - 10 μg zu erwarten war. Als Referenz wurden 2 ml 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 mitgeführt. Sämtliche Proben einschließlich Referenz wurden über Phosphorpentoxid P_2O_5 2 Tage lang im Exsikator getrocknet. Die Ansätze wurden am Rabbit-System RPA2 mit einer thermalen Neutronenfluss-Dichte von $1,5 \times 10^{13} / \text{cm}^2 \text{ s}$ bestrahlt und ohne weitere chemische

Behandlung direkt an einem hochsensitiven Ge-Detektor mit einer relativen Effizienz von 40 % nach Kühlung gemessen.

Die Messungen wurden zunächst nach 30 min Bestrahlung durchgeführt. Anschließend wurde die Bestrahlungszeit auf 60 min erhöht, um die Zählrate der langlebigen Isotope ^{59}Fe und ^{65}Zn zu erhöhen. Die Proben wurden nach einer Abkühlzeit von 7 - 10 Tagen gemessen, um den Einfluss der hohen Aktivität des ^{24}Na zu reduzieren. Mehr als 20 Isotope konnten bestimmt werden durch Nutzung der k_0 -Methode. Mo wurde durch Zählen der dominierenden γ -Linie seines Tochterisotops $^{99\text{m}}\text{Tc}$ bei 140,5 keV bestimmt. Aufgrund der sehr geringen Zählrate von ca. 10^{-2} cps wurden ^{59}Fe und ^{65}Zn an der nahest möglichen Position zum Detektor 2 Tage lang gemessen. Hierdurch konnte der Fehler beim Zählen auf unter 10 % gesenkt werden.

2.27.4 Bestimmung von Metallen durch Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS)

Eine Vielzahl von Spurenelementen kann nahezu gleichzeitig mittels ICP-MS (Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma) bestimmt werden. Die zu analysierende Flüssigkeitsprobe wird zerstäubt und in einem Plasma-Strom bei Temperaturen zwischen 5.000 und 10.000 °C ionisiert. Ein hochfrequenter Strom wird dabei in ionisiertem Argon induziert, um das Plasma zu erzeugen. Durch zwei Blenden („Sampler“ und Skimmer“) gelangen die Ionen in das Vakuumsystem des Spektrometers. Ein System elektrostatischer Linsen extrahiert die Ionen mit positiver Ladung, welche schließlich gemäß ihrem Verhältnis aus Masse und Ladung getrennt und detektiert werden. Die erhaltenen Massenspektren geben Aufschluss über die Art und Menge der gebildeten Ionen (Houk et al. 1980). Die Elemente Fe und Mo wurden mittels ICP-MS analysiert. Die Messungen erfolgten an einem Agilent 7500ce ICP-MS - Massenspektrometer mit angeschlossenem Cetac ASX-510 -Autosampler und wurden von Herrn Dr. Gunter Ilgen am Bayreuther Zentrum für Ökologie und Umweltforschung (BayCEER, Dr. Hans-Frisch-Straße 1-3, 95448 Bayreuth) durchgeführt.

Zur Probenvorbereitung wurde aufgereinigte CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante im Vorfeld nass-chemisch verascht. Die Konzentration und das Probenvolumen (ca. 100 μl) wurden dabei so gewählt, dass ein Metallgehalt von 100 $\mu\text{g/L}$ zu erwarten war. Die Proben wurden in Reagenzgläsern (zweifach mit 10 % HCl ausgekocht, um Kontaminationen zu vermeiden) mit 500 μl 65 % HNO_3 und einem Tropfen 35 % HCl

versetzt und anschließend im Thermoblock für 60 min bei 250 °C inkubiert. Eine Glasmurmelt auf den Reagenzgläsern stellte dabei sicher, dass kondensierte Flüssigkeit nicht verloren ging. Nach Abkühlen der Röhrchen wurden die Reagenzgläser mit 500 µl H₂O_{bidest} gespült und 20 µl H₂O₂ (30 % v/v) zugegeben. Nach 2 h Inkubation bei 110 - 130 °C und erneutem Abkühlen konnte das Kondensat abpipettiert werden. Die Reagenzgläser wurden ein weiteres Mal mit H₂O_{bidest} gespült und die Ansätze im Messkolben auf 5 ml aufgefüllt.

2.28 Bestimmung des FAD-Gehalts

Zur Bestimmung von FAD als einen wesentlichen Kofaktor von CO-Dehydrogenase wurden 600 µl Enzymlösung (1 - 2 mg Protein) mit 60 µl 50 % (w/v) Trichloressigsäure versetzt. Der Ansatz wurde gründlich gemischt und 30 min lang bei 4 °C inkubiert. Im Zuge der Trichloressigsäure-Behandlung denaturiert das Protein, der Kofaktor wird freigesetzt. Nach Inkubation wurde die Suspension mit 340 µl 2,4 M K₂HPO₄ neutralisiert. Das denaturierte Protein wurde abzentrifugiert (13.000 x g für 10 min) und die Extinktion des klaren Überstandes, der das Flavin enthielt, bei 450 nm gemessen. Anschließend wurden ein paar Kristalle Na-Dithionit zum oxidierten Flavin hinzugegeben und die Extinktion im reduzierten Zustand erneut gemessen. Mit Hilfe des millimolaren Redox-Differenz-Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{450} = 10,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Waud et al. 1975) kann aus der Extinktionsdifferenz der Gehalt des Flavins berechnet werden.

2.29 Chemische Rekonstitution des aktiven Zentrums von CO-Dehydrogenase

2.29.1 Inaktivierung mit Kaliumcyanid

Aufgereingte CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* OM5 (Wildtyp und Mutanten) mit einer Konzentration von 1 - 25 mg/ml wurde in luftdicht verschlossenen Klarglasgefäßen evakuiert und mit N₂ begast. Zu dem anaeroben Enzym wurde anschließend anaerobes KCN (Stammlösung 250 mM) zu einer Endkonzentration von 5 mM gegeben und der Ansatz 16 - 20 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überschuss an KCN wurde nach Inkubation mittels Gelfiltration an einer PD-10 Säule (Sephadex G-25; GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien) abgetrennt. Das inaktivierte Enzym konnte anschließend durch Ultrafiltration

an einer Membran mit 10 - 100 kDa Ausschlussgrenze (Vivaspin II - Konzentratoren, Sartorius, Göttingen, Deutschland) zur gewünschten Konzentration aufkonzentriert werden.

2.29.2 Rekonstitution des cyanolysierbaren Schwefels

Die Resulfurierung von CO-Dehydrogenase-Proben (nach KCN-Inaktivierung oder Mutantenzym) erfolgte unter strikt anaeroben Bedingungen unter einer N₂-Atmosphäre. Das Enzym (Konzentration 1 - 25 mg/ml in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2) wurde hierzu in luftdicht verschlossenen Klarglasgefäßen 30 min evakuiert und mit N₂ begast. Mit einer gasdichten Hamiltonspritze wurde der Enzymlösung eine frisch angesetzte anaerobe Na₂S-Lösung (Stammlösung 100 mM in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2) zu einer Endkonzentration von 5 mM zugegeben. Nach 5 min wurde eine frisch angesetzte anaerobe Na-Dithionit-Lösung (Stammlösung 100 mM in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2) zu einer Endkonzentration von 5 mM zugegeben und der Reaktionsansatz 16 - 20 h bei 36°C unter Ausschluss von Licht inkubiert. Überschüssige Schwefelreaktanden wurde nach der Inkubation durch anaerobe Gelfiltration an einer PD-10 Säule (Sephadex G-25; GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien) entfernt und die Enzymproben anaerob in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 aufgefangen.

2.29.3 Rekonstitution des Kupfer (I)

Die Cu-Rekonstitution erfolgte nach der Methode von Morpurgo et al. (1984). Proben von CO-Dehydrogenase (nach Sulfurierung oder Mutantenzym) mit einer Konzentration von 1 - 15 mg/ml in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 wurden in luftdicht verschlossenen Klarglasgefäßen evakuiert und mit N₂ begast. Für die Kupruierung wurde zunächst ein Cu[SC(NH₂)₂]₃Cl - Komplex als 10 mM Stammlösung hergestellt: 30 mM Thioharnstoff und 10 mM Ascorbinsäure wurden in anaeroben H₂O_{dest} gelöst. Durch 30 min Evakuieren und mehrfaches Be- und Entgasen wurde der Gasraum durch N₂ ersetzt. Diese Lösung wurde anschließend unter strikt anaeroben Bedingungen zu anaerobem CuCl (10 mM) gegeben und 20 min gerührt. Mit einer gasdichten Hamiltonspritze wurde der Kupfer-Thioharnstoff-Komplex schließlich zu einer Endkonzentration von 125 µM zur Enzymlösung pipettiert und der Ansatz bei 36 °C unter Ausschluss von Licht inkubiert. Überschüssige Reaktanden konnten nach erfolgter Inkubation mittels Gelfiltration wie unter Kap. 2.29.2 beschrieben abgetrennt werden.

2.30 Kristallisation der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* OM5 F::km

Zur Gewinnung von Proteinkristallen von CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* OM5 wurde das Dampfdiffusionsverfahren im „hängenden Tropfen“ angewendet (Ducruix und Giege 1992). Die Kristallisation erfolgte in einem geschlossenen System. Über einem Reservoir mit hoher Präzipitanzkonzentration (Salze und organische Lösungsmittel) wurde ein Protein-Tropfen mit niedriger Präzipitanzkonzentration positioniert. Flüchtige Komponenten wie Wasser und organische Lösungsmittel diffundieren aus dem Tropfen bis zur Einstellung eines Gleichgewichts zwischen Reservoir und dem Tropfen. Wird die Löslichkeitsgrenze des Proteins überschritten, kommt es zur Kristallisation.

Die Kristallisation der CO-Dehydrogenase wurde wie bei Gremer (2000) beschrieben, durchgeführt. Als Reaktionsgefäße dienten Gewebe-Kulturschalen mit 24 Kammern (Innendurchmesser 16 mm; Iwaki microplates, Dunn Labortechnik, Asbach, Deutschland). In jede Kammer wurden 700 µl Kristallisationslösung pipettiert. Die Ränder der Reaktionskammern wurden mit einer Mischung aus Rotisilan A und B (Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingefettet. Auf einem mit Dichlordimethylsilan (1 % in Toluol p.A.) hydrophobisiertem Deckgläschen wurde ein Tropfen aufgetragen, der sich aus 6 - 8 µl CO-Dehydrogenase (18 - 30 mg/ml) und 2,60 bis 3,20 µl Kristallisationslösung zusammensetzte. Das Deckgläschen wurde danach mit dem Tropfen nach unten auf die mit Silikonöl eingefettete Vertiefung gelegt. Die Kristallisationsansätze wurden bei 4 °C inkubiert und regelmäßig über Lichtmikroskopie auf das Entstehen bzw. Vorhandensein von Kristallen überprüft.

Kristallisationslösung:

- 0,8 M KH_2PO_4 /KOH-Puffer, pH 7,5
- 0,8 M NaH_2PO_4 /NaOH-Puffer, pH 7,5
- 80 mM HEPES/NaOH, pH 7,5
- 3 % 2-Methyl-2,4-pentandiol (MPD)

2.31 Alkylierung / „Verkappung“ von Cystein-Resten

Zur Aufklärung der Struktur des aktiven Zentrums der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 wurden Versuchsansätze zur Verkappung von

Sulfhydryl-Gruppen (insbesondere des γ -Schwefels des Cystein³⁸⁸ im aktiven Zentrum) durchgeführt und mögliche Auswirkungen auf Aktivität und Rekonstituierbarkeit untersucht.

CO-Dehydrogenase (Wildtyp-Präparate oder Mutanten-Enzym) mit einer Konzentration von 2 - 5 mg/ml in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ pH 8,5 wurde in Klarglasgefäßen 30 min evakuiert und der Gasraum durch mehrfaches Be- und Entgasen durch N_2 ersetzt. Mit einer gasdichten Hamiltonspritze wurde unter anoxischen Bedingungen das „Verkappingsreagenz“ zugegeben. Dieses wurde zunächst in Klarglasgefäßen eingewogen, evakuiert und mit N_2 begast und anschließend in anoxischem $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gelöst. Die Alkylierungsmittel, Iodacetamid (IAA) oder *N*-Ethylmaleinimid (NEM), wurden jeweils zu einer Endkonzentration von 3 - 5 mM zugegeben (Stammlösung jeweils 250 mM). Nach Inkubation (1 - 16 h) bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht wurde der Überschuss an Verkappingsreagenz durch anaerobe Gelfiltration an einer PD-10 Säule (Sephadex G-25; GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien) sowie durch Dialyse gegen 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ pH 8,5 entfernt. Die Enzym-Präparate konnten nun auf ihre Rekonstituierbarkeit wie unter Kap. 2.29.2 und 2.29.3 beschrieben, analysiert werden.

2.32 Alkylierung von CO-Dehydrogenase mit ^{14}C -Iodacetamid

2.32.1 Ermittlung des Anteils an gebundenem ^{14}C -Iodacetamid in Lösungen von CO-Dehydrogenase

Die Bindung von ^{14}C -Iodacetamid (50 mCi/mmol, 0,1 mCi/ml; ARC American Radiolabeled Chemicals Inc., St. Louis, Missouri, USA) an verschiedene CO-Dehydrogenase-Spezies wurde mittels eines Low Activity Liquid Scintillation Analyzer (Tri-Carb 2900TR, PerkinElmer, Shelton, Connecticut, USA) ermittelt. CO-Dehydrogenase-Proben wurden wie unter Kap. 2.31 vorbereitet und mit ^{14}C -IAA in einer Endkonzentration von 0,5 - 12,5 mM mit jeweils 400.000 dpm versetzt. Hierfür wurde zunächst eine anoxische 250 mM Stammlösung von „kaltem“ IAA hergestellt und diese mit einem entsprechenden Volumen an ^{14}C -IAA versetzt. Aus dieser radioaktiven Stammlösung wurde anschließend mit einer Hamiltonspritze ein entsprechendes Volumen zum CO-Dehydrogenase-Präparat pipettiert. Die Ansätze wurden 1 h unter Ausschluss von Licht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Inkubation wurde der Proteinanteil durch Zugabe einer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung in einer Endkonzentration von 2,7 M (Stammlösung 4,05 M) ausgefällt und abzentrifugiert (10.000 x g, 20 °C, 10 min). Der

Überstand wurde abgenommen und zum „Waschen“ des Pellets wurde letzteres in 400 µl $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ pH 8,5 gelöst. Es folgten vier weitere Ausfäll- und Waschschrte, ehe das Pellet in 200 µl $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ pH 8,5 aufgenommen wurde. Anschließend wurde der gesamte Ansatz in ein Messröhrchen (Szintillationsmessflaschen 20 ml Vial, Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit 10 ml Szintillationscocktail (Rotiszint Eco Plus, LCS-Universalcocktail, Roth, Karlsruhe, Deutschland) überführt. Durch vorsichtiges Schwenken wurde die Probe im Szintillationscocktail gelöst und die Probe nach 30 min Standzeit schließlich gemessen. Um Rückschlüsse über den Verbleib der Radioaktivität gewinnen zu können, wurden 200 µl der jeweiligen Waschfraktionen in analoger Weise in 10 ml Szintillationscocktail überführt und gemessen. Jede Probe wurde zehnfach analysiert und ein entsprechender Mittelwert mit Standardabweichung berechnet.

Bei dem verwendeten Low Activity Liquid Scintillation Analyzer handelt es sich um einen Szintillationszähler mit externer Standardisierung (^{133}Ba). Der Standard eliminiert die Auswirkungen und Effekte von Abweichungen in den Probenvolumina, sowie möglicher Lichtblitze, welche vom Plastikgehäuse des Vials oder des Szintillationscocktails ausgehen können. Die von der ^{133}Ba -Quelle ausgehende Compton-Verschiebung imitiert den Quench von β -Radionukliden geringer Energie. Quench-Standards sind in einer internen Bibliothek gespeichert. Die Szintillationsmessungen erfolgten Zeit-aufgelöst mit folgenden Parametern:

Assay Type: DPM (Single)

Nuclide: ^{14}C

Quench Indicator: tSIE/AEC

External Std Terminator (sec): 0.5 2s%

Pre-Count Delay (min): 1.00

Quench Set:

Low Energy: ^{14}C

Count Time (min): 3.00

Count Mode: Normal

Assay Count Cycles: 1

Repeat Sample Count: 10

#Vials/Sample: 1

Calculate % Reference: Off

Background Subtract: On - IPA

Low CPM Threshold: Off

2 Sigma % Terminator: Off

Regions	LL	UL	Bkg Subtract
A	0.0	156.0	20.75
B	4.0	156.0	15.90
C	0.0	0.0	0.00

Static Controller:	On	Luminescence Correction: n/a
Colored Samples:	Off	Heterogeneity Monitor: n/a
Coincidence Time (nsec):	18	Delay Before Burst (nsec): 75

Half Life Correction: Off

Proteinfällung mit Trichloressigsäure

Ammoniumsulfat fällt Proteine unter Erhaltung ihrer Struktur aus. Alternativ hierzu wurde die CO-Dehydrogenase in verschiedenen Ansätzen nach Inkubation mit ^{14}C -IAA mit Trichloressigsäure (TCA) ausgefällt und denaturiert. Nach TCA-Zugabe (Endkonzentration 1,33 M, Stammlösung 4,0 M) wurde der Ansatz zentrifugiert (10.000 x g, 20 °C, 10 min) und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde anschließend in 200 µl 2 M NaOH gelöst, der Ansatz in 10 ml Szintillationscocktail überführt und nach 30 min Standzeit gemessen.

2.32.2 Ermittlung des Anteils an gebundenem ^{14}C -Iodacetamid über denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

CO-Dehydrogenase (0,8 mg) aus *O. carboxidovorans* OM5 (Wildtyp-Präparate und Mutanten) wurde zunächst wie unter Kap. 2.32.3 beschrieben mit ^{14}C -Iodacetamid (Endkonzentration 3 mM, $2,0 \times 10^6$ dpm) inkubiert. Nach Ausfällen des Proteins mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und viermaligem Waschen des Pellets wurde das Protein in 200 µl $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ pH 8,5 aufgenommen und mit 200 µl des entsprechenden Kochpuffers (Kap. 2.17) versetzt. Es wurde Probenpuffer sowohl mit als auch ohne β -Mercaptoethanol verwendet. β -Mercaptoethanol spaltet Disulfidbrücken innerhalb von Proteinstrukturen. Sollte Iodacetamid an persulfidischen Schwefelatomen binden (Pan und Carrol 2013; Tomblin et al. 2013), würde dies zur Ausbildung von Disulfidbrücken führen, die durch β -Mercaptoethanol gespalten werden können. In diesem Fall würde gebundenes ^{14}C -IAA abgespalten werden und keine Radioaktivität im Gel mehr detektierbar sein.

Die Proben wurden 10 min im Wasserbad gekocht bevor sie in die Gel-Taschen pipettiert wurden (60 µg Protein pro Bahn). Dabei wurden die Auftragsvolumina so gewählt, dass pro Tasche 1.200 - 2.500 dpm aufgetragen wurden. Die PAGE erfolgte wie unter Kap. 2.17 beschrieben. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit Coomassie Brilliant

Blau R250 für 1 - 2 h gefärbt und anschließend für 2 - 4 h entfärbt. Die gefärbten Proteinbanden wurden ausgeschnitten und in Klarglasgefäße überführt. Dabei wurden die Banden der L-, M- und S-Untereinheiten von CO-Dehydrogenase jeweils in separaten Gefäßen vereint. Die Gelblöckchen wurden zerkleinert und konnten durch 12 h Inkubation bei 60 °C in 200 - 300 µl H₂O₂ (30 % v/v) und wenigen Tropfen 2 M NaOH aufgelöst werden (modifiziert nach Tishler und Epstein 1968; Strand und Sypherd 1969; Goodman und Matzura 1970). Die erhaltene Lösung wurde zur Messung in 10 ml Szintillationscocktail überführt.

2.33 Inkubation von CO-Dehydrogenase-Präparaten mit Schwefelverbindungen zum Erhalt von Strukturinformationen

Kreß et al. (2014) konnten zeigen, dass Schwefelverbindungen wie β-Mercaptoethanol einen Einfluss auf die CO-oxidierende Aktivität der wildtypischen CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* OM5 besitzen. Mittels EXAFS konnte nachgewiesen werden, dass die R-SH-Verbindung an das Cu(I)-Ion im aktiven Zentrum von CO-Dehydrogenase bindet. Um Informationen über das aktive Zentrum von Biosynthese-Vorstufen von CO-Dehydrogenase zu erhalten (Präparate aus der *coxF*-Mutante) wurde untersucht, ob Schwefelverbindungen auch hier an das aktive Zentrum binden können und diese Bindung mittels ESR-spektroskopischer Messungen veranschaulicht werden kann.

CO-Dehydrogenase-Präparate (mind. 500 µl mit 12 mg/ml in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2) wurden in luftdicht verschlossenen Klarglasgefäßen evakuiert (30 min), mit N₂ begast und schließlich mit verschiedenen Schwefelverbindungen inkubiert. Diese wurden hierfür ebenfalls in Klarglasgefäßen eingewogen, evakuiert und in anaeroben H₂O_{dest} gelöst. Die Zugabe erfolgte in der entsprechenden Endkonzentration mit Hilfe einer gasdichten Hamiltonspritze. Nach Inkubation wurde der jeweilige Ansatz schließlich unter N₂-Fluss in ein ESR-Röhrchen überführt und schockgefroren.

Bei den Schwefelverbindungen handelte es sich dabei um L-Cystein (15 mM), Na-Sulfid (15 µM) und β-Mercaptoethanol (15 mM), die Inkubationszeit betrug jeweils 25 min. Um den Einfluss von Na-Dithionit auf die Interaktion der R-SH-Verbindung mit dem aktiven Zentrum zu untersuchen, wurden separate Ansätze nach der Inkubationszeit zusätzlich mit diesem Reagenz versetzt und 16 h bei 37 °C inkubiert. Nach Inkubation erfolgte die Überführung in ESR-Röhrchen und das Einfrieren in flüssigem N₂. Die ESR-Messungen wurden wie unter Kap. 2.26.2 beschrieben, durchgeführt. Zur Interpretation der erhaltenen

Daten wurden verschiedene Referenzen (Wildtyp-Präparate, Cyanid-behandeltes Wildtyp-Enzym sowie Cyanid-behandeltes und sulfuriertes Wildtyp-Enzym) in analoger Weise behandelt und gemessen.

2.34 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Zur Untersuchung bzw. Visualisierung einer möglichen Oligomerisierung von rekombinantem, rückgefaltetem CoxF aus Einschlusskörpern wurden Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen am Max-Planck Institut für molekulare Genetik (Ihnestraße 73, 14195 Berlin, Deutschland) durchgeführt. Die Elektronenmikroskopie erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Thorsten Mielke und Jörg Bürger.

Zunächst wurden löchrige Kohlefilme (300 mesh R2/4 Quantifoil® grids, Quantifoil Micro Tools GmbH, Jena, Deutschland) durch Ausglühen entladen und mit einer Kohleschicht überzogen. Nach Ionisierung im Vakuum durch Anlegen von Hochspannung (Plasma Cleaner, Harrik Plasma, Ithaca, USA) konnten 3,5 µl Proteinlösung aufgetragen werden. Die Proteinkonzentration betrug 10 - 20 ng/µl. Nach 45 sec Inkubation bei Raumtemperatur wurde überschüssige Flüssigkeit mittels eines Filterpapiers abgesaugt. Durch Zugabe von 2 % (w/v) Uranylacetat wurde gebundenes Protein negativ-kontrastiert. Erneut wurde überschüssige Flüssigkeit abgesaugt. Die Begutachtung der Präparate erfolgte bei einer 28.500-fachen Vergrößerung mit einem Philips CM100 Elektronenmikroskop, welches bei 100 kV betrieben wurde.

2.35 Bioinformatische Analyse von Proteinsequenzen und Vorhersage von Sekundärstruktur-Elementen

Anhand der jeweiligen Aminosäure-Sequenz wurden für CoxF und CoxG mithilfe des ExPASy ProtParam tool (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam>) physikalische und chemische Parameter berechnet. Diese umfassen u. a. das Molekulargewicht, den isoelektrischen Punkt, die Aminosäure-Zusammensetzung, den Extinktionskoeffizienten und die geschätzte Halbwertszeit.

Die Vorhersage von Sekundärstruktur-Elementen, transmembranen Domänen und der Solvens-Zugänglichkeit erfolgte mittels des Online-Servers SABLE (Solvent AccessiBiLitiEs

of amino acid residues in proteins and improved prediction of secondary structures; <http://sable.cchmc.org>; Adamczak et al. 2004).

Motive und Schlüsselemente wurden über verschiedene Protein-Datenbanken des ExPASy Bioinformatics Resource Portal Servers (ScanProsite-Tool, <http://prosite.expasy.org/scanprosite/>, Sigrist et al. 2002, 2012; myhits, <http://myhits.isb-sib.ch/>, Pagni et al. 2007) und die Conserved Domain Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>, Marchler-Bauer A et al. 2011) ermittelt.

Sequenz-Alignments wurden mithilfe des Online-Servers T-Coffee (<http://www.tcoffee.org>) sowie über das ExPASy LALIGN tool (http://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html, Huang und Miller 1991) durchgeführt, Polypeptide mit ähnlicher Sequenz wurden durch das ExPASy-Programm BLAST2 (<http://web.expasy.org/blast>, Altschul et al. 1997) ermittelt.

Eine Auflistung von Phosphatasen oder Phosphatase-ähnlichen Proteinen von *O. carboxidovorans* OM5 konnte über den UniProt-Server (<http://www.uniprot.org>) erhalten werden.

3 Ergebnisse

3.1 Bioinformatische Charakterisierung des CoxF-Polypeptides

Das akzessorische Gen *coxF* ist Bestandteil des Subclusters *coxDEFG* und liegt stromabwärts der Strukturgene *coxMSL* von CO-Dehydrogenase. Vier Nukleotide stromabwärts von *coxE* beginnt das Gen, es umfasst 843 Nukleotide. Ferner überlappt ein Adenin des Stopcodons von *coxF* mit dem Startcodon vom nachfolgenden Gen *coxG* (Santiago et al. 1999).

Das Genprodukt CoxF, welches aus der DNA-Sequenz abgeleitet werden kann, umfasst 280 Aminosäuren. Rechnerisch ergibt sich eine molekulare Masse von 29,346 kDa. Sequenzanalysen (Kap. 2.35) sagen ein cytoplasmatisches Protein voraus, welches als „stabil“ klassifiziert wird und einen von der Aminosäure-Sequenz abgeleiteten, theoretischen pI von 6,22 besitzt.

Tab. 3-1 gibt eine Übersicht über Polypeptide mit teilweise noch unbekannter Funktion (abgeleitet von deren offenen Leserahmen), die signifikante Ähnlichkeit zu CoxF besitzen (vgl. auch Santiago et al. 1999).

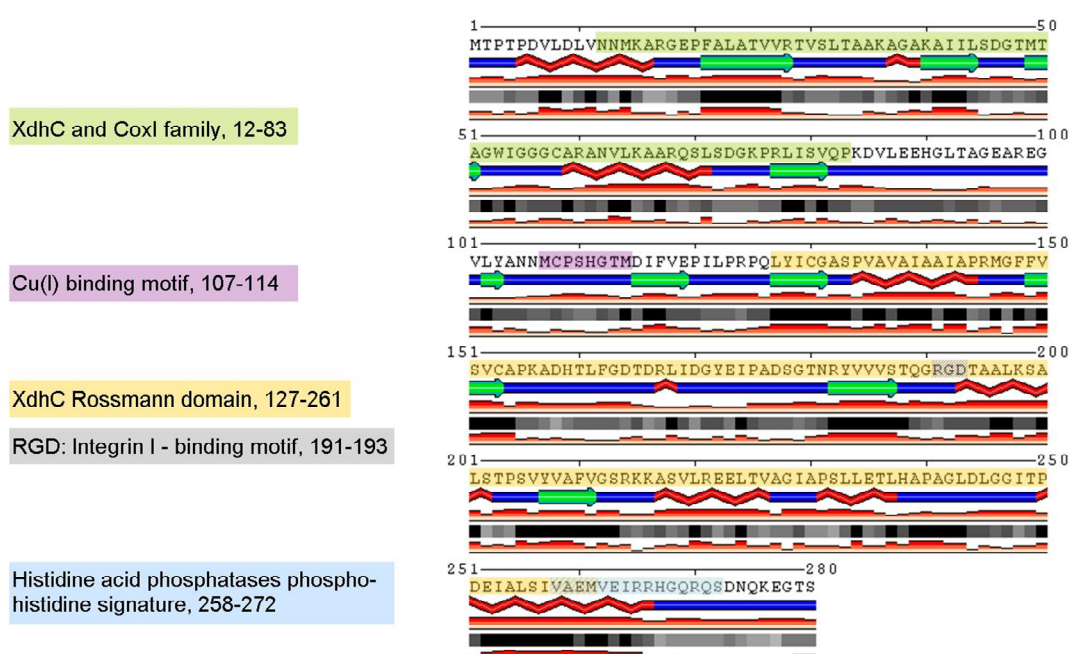
Tabelle 3-1: Vergleich des CoxF-Proteins aus *O. carboxidovorans* OM5 mit anderen Polypeptiden teilweise noch unbekannter Funktion.

Aufgeführt sind neben der Anzahl an Aminosäuren des jeweiligen Proteins die Sequenzverwandtschaft sowie die Identität und Ähnlichkeit des Leserasters.

Organismus	Protein (Anzahl an Aminosäuren)	Sequenz- Verwandtschaft	Identität (%)	Ähnlichkeit (%)	Referenz
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	XdhC (312)	16 - 68 174 - 265	39,6 20,7	86	Leimkühler und Klipp 1999
<i>Aeropyrum pernix</i>	APE2227 (298)	6 - 278	32	64	Kawarabayasi et al. 1999
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Orf6 (107)	1 - 100	31	63	Lorite et al. 1997
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Orf7 (176)	125 - 275	29	59	Lorite et al. 1997
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	MTV036.7c (264)	7 - 269	31	58	Philipp et al. 1996
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Rv0372c (251)	7 - 268	31	58	Cole et al. 1998

Mittels des Online-Servers SABLE (Kap. 2.35) wurde eine Vorhersage der Sekundärstruktur-Elemente des CoxF-Polypeptids auf Basis der Aminosäure-Sequenz durchgeführt (vgl. Tab. 3-2). Ferner wurde die Sequenz über verschiedene Protein-Datenbanken des ExPASy Bioinformatics Resource Portal Servers und die Conserved Domain Database (Kap. 2.35) auf Motive und Schlüsselemente untersucht. Die erhaltenen Daten sind in Abb. 3-1 zusammengefasst.

A



B

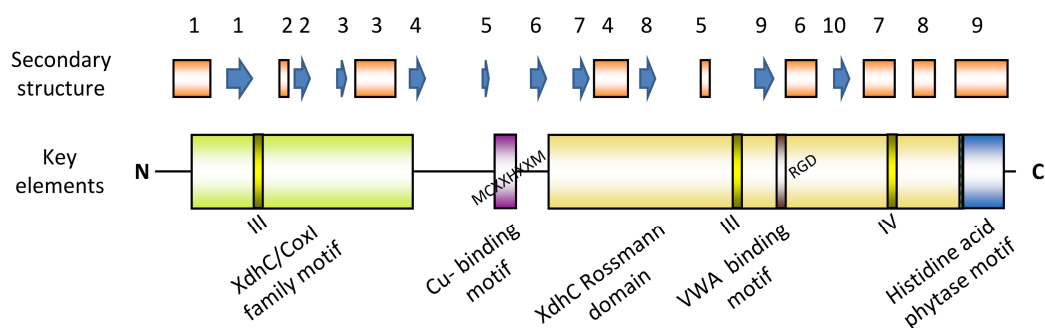


Abbildung 3-1: Vorhergesagte Sekundärstruktur des CoxF-Proteins aus *O. carboxidovorans* OM5, sowie Motive und Schlüsselemente.

(A) Die Vorhersage der Sekundärstruktur von CoxF erfolgte mit Hilfe des Servers SABLE (Solvent AccessiBiLitiEs of amino acid residues in proteins and improved prediction of secondary structures; Adamczak et al. 2004). Neben den Sekundärstrukturelementen wie α -Helices (rot) und β -Faltblättern (grün) sowie ungeordneten Bereichen und *turns* (blau) ist das Maß der Hydrophobizität dargestellt. Stark hydrophobe Bereiche sind schwarz gekennzeichnet, weniger hydrophobe Bereiche sind durch heller werdende Graustufen wiedergegeben. Die Sequenz wurde zusätzlich über verschiedene Protein-Datenbanken des ExPASy Bioinformatics Resource Portal Servers und Conserved Domain Database auf Schlüsselemente und Motive untersucht, welche unter Angabe der Aminosäuren in der Abbildung entsprechend gekennzeichnet sind. In (B) sind die Ergebnisse übersichtsartig zusammengefasst. Unterhalb der Sekundärstruktur sind die in der Sequenz enthaltenen Motive – das Motiv der XdhC/CoxI-Familie, die Cu(II)-Bindestelle MCXXHXXM, das VWA-Bindemotiv RGD, welches in der XdhC-Rossmann Domäne liegt, sowie C-terminal das saure Histidin-Phytase-Motiv – dargestellt. Farbcode: α -Helices orange; β -Faltblätter blau; Motive der DEAD-Box Proteinfamilie gelb.

Tabelle 3-2: Vorhergesagte Strukturelemente und deren prozentualer Anteil in der Sequenz von CoxF aus *O. carboxidovorans* OM5.

Die Vorhersage der Sekundärstruktur erfolgte über den Online-Server SABLE (Solvent AccessiBiLitiEs of amino acid residues in proteins and improved prediction of secondary structures; Adamczak et al. 2004).

Strukturelement	Anzahl Aminosäuren	prozentualer Anteil
α -Helices	85	30,35
β -Faltblätter	49	17,50
<i>turns</i> / ungeordnet	146	52,15

Die Auswertung der vorhergesagten Sekundärstruktur von CoxF ergibt, dass sich das Protein aus 9 α -Helices (orange) und 10 β -Faltblättern (blau) zusammensetzt (Abb. 3-1, B). Der α -helikale Anteil beträgt damit 30,35 %, der Anteil an β -Faltblättern 17,50 %. Die verbleibenden Bereiche sind *loops* und ungeordneten Bereichen zuzuschreiben. Für das N-terminale Ende wird ein Motiv der XdhC/CoxI-Familie vorhergesagt, einhergehend mit einer XdhC-Rossmann Domäne nahe dem C-Terminus. Ein paarweises Alignment (ExPASy LALIGN-Tool, Kap. 2.35) mit der Sequenz des XdhC-Polypeptides aus *Rhodobacter capsulatus* ergab 39,6 % Identität für ersteres XdhC-Motiv, 20,7 % Identität für das Motiv der XdhC-Rossmann Domäne sowie eine insgesamt Ähnlichkeit von 86 %. Die Sequenz M¹⁰⁷CPSHGTM kann als mögliches Bindemotiv für Cu(II)-Ionen angesehen werden. So ist

für sog. blaue Kupferenzyme (Cu-Enzyme vom Typ 1, welche Funktionen im Elektronentransfer besitzen) eine Aminosäure-Anordnung bestehend aus Histidin, Cystein, Histidin und Methionin als Liganden des Cu charakteristisch (Karlin et al. 1997). Ersterer Histidin-Rest ist häufig alleinstehend – hierbei könnte es sich in der CoxF-Sequenz um das Histidin⁹⁰ handeln. Die weiteren Aminosäure-Liganden bilden meist ein CX_mHX_nM-Motiv aus (*m* und *n* meist 2 - 4), welches mit der Sequenz auf CoxF übereinstimmt. Blaue Kupferenzyme mit dieser Aminosäure-Anordnung bilden meist eine ähnliche lokale 3D-Konformation aus. Beispiele hierfür sind Nitrit-Reduktase, Ascorbat-Oxidase oder Ceruloplasmin (Karlin et al. 1997).

Die Sequenz R¹⁹¹GD stellt ein Integrin- (VWA-) Bindemotiv dar (Whittaker und Hynes 2002), welches Protein-Protein-Interaktionen mit einer entsprechenden Integrin-Domäne ermöglicht.

Für das C-terminale Ende wird ein für saure Histidin-Phytsen charakteristisches Motiv vorhergesagt (van Etten et al. 1991; Yao et al. 2012). Dieses überschneidet sich in drei Aminosäuren mit der XdhC-Rossmann Domäne. Phytsen stellen eine Unterfamilie der sauren Histidin-Phosphatasen dar und katalysieren die Hydrolyse von Phytat (*myo*-Inositol-Hexakisphosphat) zu *myo*-Inositol und anorganischem Phosphat (Mitchell et al. 1997). Es handelt sich dabei um eine Unterklasse von Phosphatasen, deren Phosphoryl-Transfer-Reaktion über ein Phosphohistidin-Intermediat abläuft (van Etten 1982). Die Sequenz V²⁵⁸AEMVEIRRHGQRRQS²⁷² am C-Terminus von CoxF wird als eines von zwei Motiven der Histidinsäurephosphatase-Phosphohistidin-Signatur vorausgesagt, welches allerdings üblicherweise am N-Terminus lokalisiert ist. Sowohl für eukaryontische als auch prokaryontische saure Phosphatasen/Phytsen kann folgende Konsensus-Sequenz angegeben werden (van Etten et al. 1991):

N-Terminus:

[LIVM]-X(2)-[LIVMA]-X(2)-[LIVM]-X-R-H-[GN]-X-R-X-[PAS]

C-Terminus:

[LIVMF]-X-[LIVMFAG]-X(2)-[STAGI]-H-D-[STANQ]-X-[LIVM]-X(2)-[STA]

Die beiden Histidine sind essentiell für den katalytischen Mechanismus (Ostanin et al. 1992; Schneider et al. 1993). Während das N-terminale Histidin bei der Bildung von Phosphohistidin-Intermediaten beteiligt sein könnte, fungiert das C-terminale vermutlich als Protonendonor.

Zusätzlich finden sich auf der Sequenz von CoxF drei Motive, die der Familie der DEAD-Box RNA-Helikasen zugeschrieben werden können. Mitglieder dieser Familie nutzen ATP, um DNA- und RNA-Protein-Strukturen zu rearrangieren. Im Zuge dessen können RNA-Doppelstränge entwunden werden sowie RNA-Protein-Interaktionen aufgehoben werden, um die Translation zu initiieren (Rocak und Linder 2004; Linder 2006; Linder und Jankowsky 2011). Charakteristisch für DEAD-Box-Proteine sind mindestens 9 konservierte Motive, welche in ATP-Bindung, RNA-Bindung und ATP-Hydrolyse involviert sind (Iost et al. 2013).

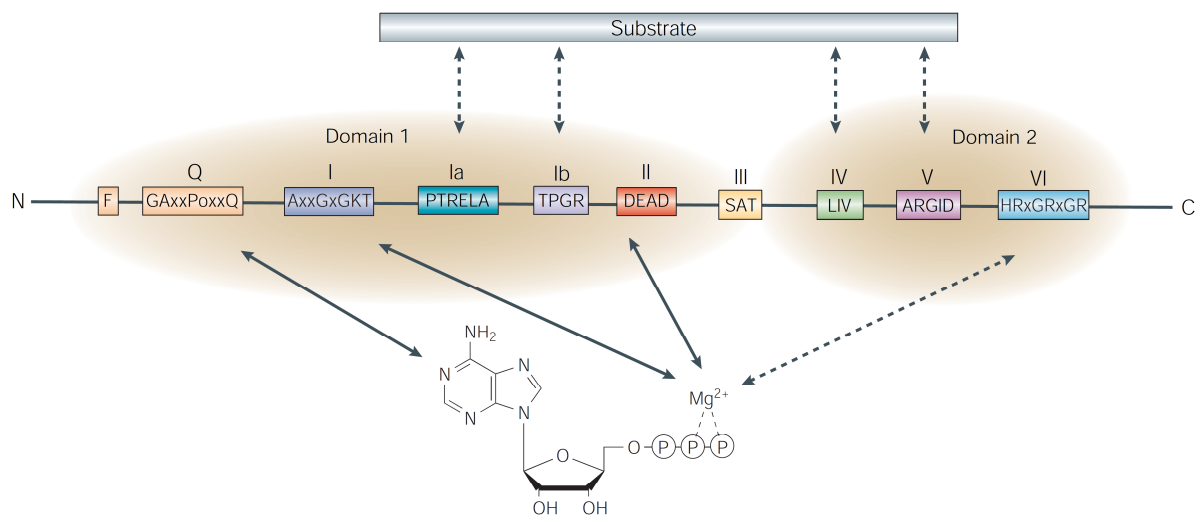


Abbildung 3-2: Konservierte Motive der Familie der DEAD-Box RNA-Helikasen (aus Rocak und Linder 2004).

Sequenz-Alignments verschiedener DEAD-Box-Proteine ergeben mindestens 9 konservierte Motive. Anhand von Mutanten-Analysen sowie auch durch strukturelle Daten konnten für viele der Konsensus-Elemente mögliche Funktionen postuliert werden. Das Q-Motiv und die Motive I und II (Walker A bzw. B) binden ATP und werden für dessen Hydrolyse benötigt. Motiv III verknüpft ATP-Bindung und -Hydrolyse mit Konformationsänderungen, welche für die Helikase-Aktivität erforderlich sind. Motiv VI scheint auch eine Funktion im Rahmen der ATP-Bindung zu besitzen, während die Motive Ia, Ib, IV und V wahrscheinlich an der Bindung der RNA beteiligt sind.

Auf CoxF finden sich die Sequenzen S³¹LT und S¹⁷⁸GT, welche als Homologe zum DEAD-Box-Motiv III (SAT) angesehen werden können, sowie L²²⁴TV, welches homolog zum DEAD-Box-Motiv IV (LIV) ist. Insgesamt ist die Anzahl der ermittelten Konsensus-Motive auf CoxF aber sehr gering, da die übrigen 7 Motive fehlen.

3.2 Bioinformatische Charakterisierung des CoxG-Polypeptides

coxG stellt das auf *coxF* unmittelbar folgende Gen innerhalb des Subclusters *coxDEFG* dar. Das Gen kodiert für ein 205 Aminosäure großes Polypeptid mit einer molekularen Masse von 21,559 kDa. Als Funktion für CoxG wurde bislang angenommen, dass das Polypeptid einen Membran-Anker für CO-Dehydrogenase darstellt. Die Beobachtung, dass in Abwesenheit von CoxG in Extrakten keine partikuläre CO-Dehydrogenase gefunden wurde, deckt sich mit dieser Annahme (Fuhrmann et al. 2003).

In Tab. 3-3 sind Polypeptide teilweise noch unbekannter Funktion aufgeführt, die eine signifikante Ähnlichkeit zu CoxG aufweisen (vgl. auch Santiago et al. 1999).

Tabelle 3-3: Vergleich des CoxG-Proteins aus *O. carboxidovorans* OM5 mit anderen Polypeptiden teilweise noch unbekannter Funktion.

Aufgeführt sind neben der Anzahl an Aminosäuren des jeweiligen Proteins die Sequenzverwandtschaft sowie die Identität und Ähnlichkeit des Leserasters.

Organismus	Protein (Anzahl an Aminosäuren)	Sequenz- Verwandtschaft	Identität (%)	Ähnlichkeit (%)	Referenz
<i>Polymorphum gilvum</i> LMG 25793	CO-DH Untereinheit G Superfamilie (197)	1 - 146	71	84	Li et al. 2011
<i>Azospirillum</i> sp. B510	CO-DH Untereinheit G (205)	1 - 146	71	83	Kaneko et al. 2010
<i>Afipia</i> sp. 1NLS2	CO-DH Untereinheit G (149)	1 - 144	70	82	Lucas et al. 2010
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	nicht charakterisiert (152)	1 - 144	66	82	Kaneko et al. 2011
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	MTV036.04c (171)	30 - 155	30	63	Philipp et al. 1996
<i>Pseudomonas thermocarboxydo- vorans</i>	Orf4 (171)	30 - 141	27	66	Pearson et al. 1994
<i>Homo sapiens</i>	Pleckstrin 2 (353)	1 - 205	13	62	Venter et al. 2001

Wie für das CoxF-Polypeptid (Kap. 3.1) wurde auch für CoxG mithilfe des Online-Servers SABLE auf Basis der Sequenz eine Vorhersage der Sekundärstruktur-Elemente durchgeführt (vgl. Tab. 3-4). Schlüsselemente und Motive konnten über verschiedene Protein-Datenbanken des ExPASy Bioinformatics Resource Portal Servers und die Conserved Domain Database (Kap. 2.35) ermittelt werden. Die hierbei erhaltenen Daten sind in Abb. 3-3 zusammengefasst.

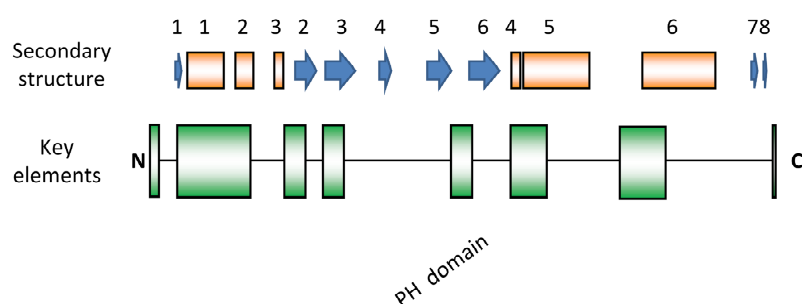


Abbildung 3-3: Vorhergesagte Sekundärstruktur-Elemente und Motive des CoxG-Polypeptides aus *O. carboxidovorans* OM5.

Die Vorhersage der Sekundärstruktur von CoxG erfolgte mit Hilfe des Servers SABLE (Solvent AccessiBiLiTiEs of amino acid residues in proteins and improved prediction of secondary structures; Adamczak et al. 2004). α -Helices sind in orange dargestellt, β -Faltblätter in blau. Die weißen Bereiche dazwischen stellen ungeordnete Bereiche und *loops* dar. Die Sequenz wurde zusätzlich über verschiedene Protein-Datenbanken des ExPASy Bioinformatics Resource Portal Servers und Conserved Domain Database auf Schlüsselemente und Motive untersucht, welche übersichtsartig zusammengefasst sind. So findet sich auf CoxG verteilt eine PH-Domäne (pleckstrin homology domain).

Tabelle 3-4: Vorhergesagte Strukturelemente und deren prozentualer Anteil in der Sequenz von CoxG aus *O. carboxidovorans* OM5.

Die Vorhersage der Sekundärstruktur erfolgte über den Online-Server SABLE (Solvent AccessiBiLiTiEs of amino acid residues in proteins and improved prediction of secondary structures; Adamczak et al. 2004).

Strukturelement	Anzahl Aminosäuren	prozentualer Anteil
α -Helices	60	29,27
β -Faltblätter	60	29,27
<i>turns</i> / ungeordnet	85	41,46

Die Auswertung der Sekundärstruktur-Daten von CoxG ergibt 6 α -Helices (orange) und 8 β -Faltblätter (blau) (Abb. 3-3). Der α -helikale Anteil beträgt wie der Anteil an β -Faltblättern 29,27 %. Die verbleibenden Bereiche können *loops* und ungeordneten Bereichen zugeordnet werden. Für CoxG wird eine Bindestelle für hydrophobe Liganden der SRPBCC (START/RHO_alpha_C/PITP/Bet_v1/CoxG/CalC)-Superfamilie vorhergesagt. Bei START (steroidogenic acute regulatory protein related lipid transfer)-Domänen handelt es sich um 200 - 210 Aminosäure große Motive, welche in einer Vielzahl von Proteinen gefunden werden können. STAR-Proteine haben zahlreiche Funktionen im Metabolismus und Transport von Lipiden. So mobilisieren sie u.a. Cholesterol und transportieren es zwischen der äußeren und inneren Mitochondrien-Membran Steroid-produzierender Zellen. Andere wiederum binden Phosphatidylcholine, wie das PC-Transfer-Protein (PC-TP) (Ponting und Aravind 1999; Tsujishita und Hurley 2000). START-Domänen werden häufig auch auf der Sequenz von PH (pleckstrin homology)-Proteinen gefunden.

Sequenz-Alignments von CoxG mithilfe des Online-Servers T-Coffee ergaben 62 % Ähnlichkeit von CoxG zum menschlichen Pleckstrin 2 - Protein. Signifikante Ähnlichkeit konnte dabei für die Aminosäure-Bereiche M¹ bis M³, R¹³ bis I³⁶, V⁴⁸ bis P⁵⁴, F⁵⁹ bis L⁶⁵, I¹⁰⁴ bis K¹¹⁰, T¹²⁸ bis K¹³⁹, E¹⁵⁵ bis A¹⁶⁸ und V²⁰⁵ ermittelt werden (Abb. 3-3). Bei PH-Domänen handelt es sich um etwa 100 verteilt-liegende, konservierte Aminosäure-Reste, welche in einer Vielzahl verschiedener Typen hauptsächlich eukaryontischer Proteine gefunden werden können und Funktionen in der Signaltransduktion, der Dynamik zellulärer Membranen und hinsichtlich des Cytoskeletts haben können. Sie binden spezifisch und teilweise mit hoher Affinität Phosphatidylinositol-Lipide innerhalb biologischer Membranen und haben zelluläre Membranen als Zielobjekt (Lemmon 2004). Ferner sind sie in der Lage direkt mit Proteinen zu interagieren. So ist die PH-Domäne der Bruton-Tyrosin-Kinase in der Lage direkt an Protein Kinase C zu binden (Yao et al. 1994).

3.3 Heterologe Expression von CoxF in *E. coli* AD494(DE3)/pSL1

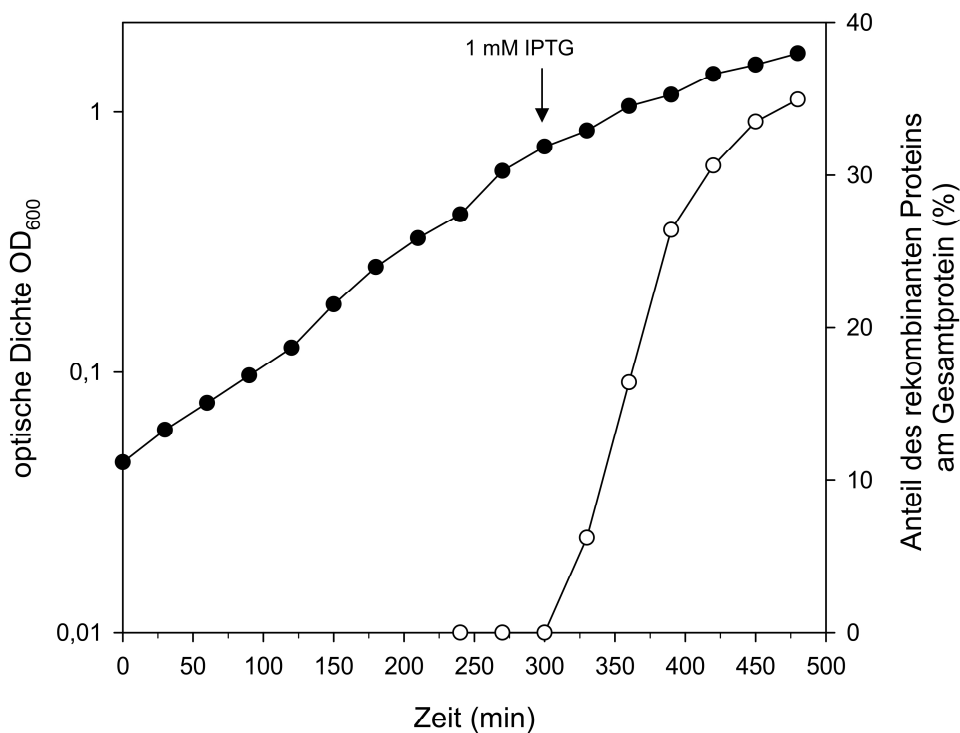
CoxF wird in Zellen von *O. carboxidovorans* OM5 als lösliches, cytoplasmatisches Protein exprimiert. Dies zeigten Analysen zur subzellulären Lokalisation über denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese, anschließendem Western-Blotting und immunologischer Detektion, sowie die immunologische Bestimmung von CoxF in Fraktionen von Saccharosedichtegradienten, in denen zellfreier Rohextrakt, Cytoplasma oder Membranen

aufgetrennt wurden (vgl. hierzu Kap. 3.8 und 3.9). Wie Transkriptionsanalysen zeigten, werden die Gene des gesamten Cox-Gencluster in annähernd gleichem Maße durch CO-Induktion transkribiert (Schübel et al. 1995). Dies schließt neben den Strukturgenen der CO-Dehydrogenase *coxL*, *coxM* und *coxS* auch die stromabwärts gelegenen akzessorischen Gene *coxD*, *coxE*, *coxF* und *coxG* ein. Eine Detektion von CoxF in Extrakten war allerdings (im Gegensatz zu den Untereinheiten von CO-Dehydrogenase CoxL, CoxM und CoxS) nur mittels spezifischer Immunglobulin G - Antikörper möglich, da die Menge an homologem CoxF in zellfreien Rohextrakten oder Cytoplasma-Fractionen von *O. carboxidovorans* OM5 offensichtlich zu gering ist und das Protein mittels alleiniger PAGE nicht detektiert werden kann (vgl. Kap. 3.8). Im Zuge dessen wurde CoxF heterolog über das pET-Expressionssystem in *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 überexprimiert. Andere Expressionssysteme wie *E. coli* BL21(DE3)/pREP4/pSL1 oder *E. coli* BL21(DE3)/pREP4/pLysS/pSL1 erwiesen sich als nachteilig, da das Protein ausschließlich in Form unlöslicher Aggregate als Einschlusskörper gebildet wurde (Leuthäuser 2000). Rekombinantes CoxL (Wastl 1996) und CoxM (Gremer et al. 2000) konnten durch Verminderung der Temperatur bei der Anzucht auf 20 °C und Herabsetzen der IPTG-Menge auf eine Endkonzentration von 0,1 mM gewonnen werden. Zwar konnten diese Bedingungen auf die Expression von CoxF in *E. coli* BL21(DE3)/pREP4/pLysS/pSL1 übertragen werden, der Anteil am Gesamtprotein lag jedoch nur bei 7,6 %, so dass eine Detektion von CoxF mittels denaturierender PAGE und Coomassie-Proteinfärbung nicht möglich war (Leuthäuser 2000).

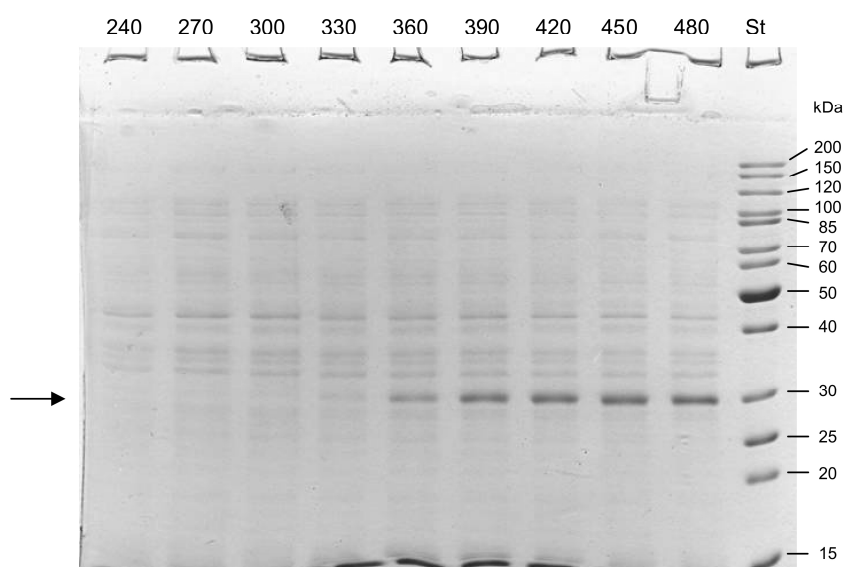
Aus den genannten Gründen wurde die Überexpression von CoxF in *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 durchgeführt. Durch die Mutation im *trxB*-Gen bietet dieser Stamm den Vorteil, dass Disulfidbrücken im ansonsten reduzierenden Milieu des Cytoplasmas von *E. coli* ausgebildet werden können (Schein und Noteborn 1988). Im Vorfeld konnte gezeigt werden, dass CoxF sowohl in löslicher Form als auch in Form von Einschlusskörpern gebildet wird (Leuthäuser 2000). Die Anzucht im Fermentor wurde wie unter Kap. 2.7.2 beschrieben, durchgeführt. Nach 300 min bei einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0,735 wurde zur Induktion der Überexpression IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Die mittlere Expressionszeit von zuvor 72,6 min erhöhte sich im Zuge dessen auf 129,5 min, die Teilungsrate sank auf 0,46 h⁻¹. Das Abernten der Zellen erfolgte nach 480 min bei einer OD₆₀₀ von 1,677. Vor der IPTG-Zugabe kam es zu keiner erkennbaren Expression von CoxF. Dies zeigte eine SDS-PAGE (Abb. 3-4, B, Bahn 1-3). Auch eine basale Expression war nicht feststellbar. Mit Hilfe eines Molekulargewicht-Standards konnte eine Eichgerade erstellt werden. CoxF besitzt ein Molekulargewicht von 29,346 kDa, abgeleitet von seiner

Aminosäure-Sequenz. Wie in Abb. 3-4, B zu erkennen ist, wird nach IPTG-Induktion ein Protein gebildet, das mit einer geringen Abweichung von 2,8 % dieser molekularen Masse entspricht. Somit kann angenommen werden, dass die Überexpression von CoxF erfolgreich war. Der Anteil von CoxF am Gesamtprotein konnte videodensitometrisch zu 34,96 % bestimmt werden.

A



B



C

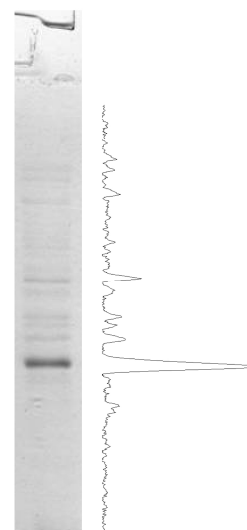


Abbildung 3-4: Heterologe Expression von CoxF aus *O. carboxidovorans* OM5 in *E. coli* AD494(DE3)/pSL1.

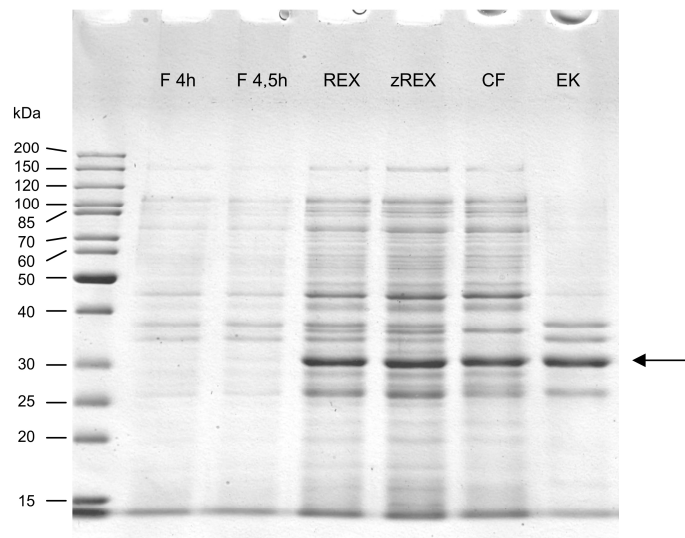
Das Protein CoxF wurde wie in Kap. 2.10 beschrieben in *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 überexprimiert und das Wachstum des Wirtstammes photometrisch verfolgt.

(A) Anzucht von *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 im Fermentor. Der Wachstumsverlauf (●) wurde photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) verfolgt. Der Zeitpunkt der IPTG-Zugabe zur Induktion der Überexpression von CoxF ist gekennzeichnet. (B) Um den Verlauf der Überexpression zu kontrollieren, wurden zeitabhängig Proben vom Fermentor entnommen und diese mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Kap. 2.17) analysiert. Hierbei wurde pro Bahn 1 OD - Einheit aufgetragen. Die Bahnen sind entsprechend ihrer Zeit der Probenentnahme gekennzeichnet. Zur Bestimmung des Molekulargewichts des gebildeten rekombinanten Proteins wurde ein Proteinstandard (PageRuler Protein Ladder; New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA) mitgeführt. (C) Densitometrische Bestimmung des Anteils von CoxF am Gesamtzellprotein am Ende der Fermentation, ausgehend von der Auftrennung der Wachstumsproben mittels SDS-PAGE. Die Zunahme des Anteils von CoxF nach Induktion durch IPTG wurde in analoger Weise für den gesamten Wachstumverlauf bestimmt (A, ○).

3.4 Heterologes CoxF-Protein wird in *E. coli* AD494(DE3) sowohl löslich als auch in Form von Einschlusskörpern gebildet

Nach Überexpression von CoxF in *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 wurden die Zellen aufgeschlossen (Kap. 2.11) und die subzelluläre Lokalisation von CoxF untersucht. Zunächst wurde der erhaltene Rohextrakt niedertourig zentrifugiert (Kap. 2.11) und das Sediment, welches Zelltrümmer, nicht aufgeschlossene Zellen und Einschlusskörper enthält, in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 aufgenommen und homogenisiert. Der nach Zentrifugation erhaltene zellfreie Extrakt wurde mittels Ultrazentrifugation in eine lösliche cytoplasmatische und eine Membran-Fraktion getrennt (Kap. 2.11). Denaturierende PAGE (Kap. 2.17) zeigte, dass CoxF sowohl in Form von Einschlusskörpern als auch löslich in der cytoplasmatischen Fraktion enthalten ist (Abb. 3-5). Das Gel wurde anschließend mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt und der Anteil von CoxF in der jeweiligen Fraktion videodensitometrisch mit dem Programm ImageJ ermittelt (Kap. 2.23).

A



B

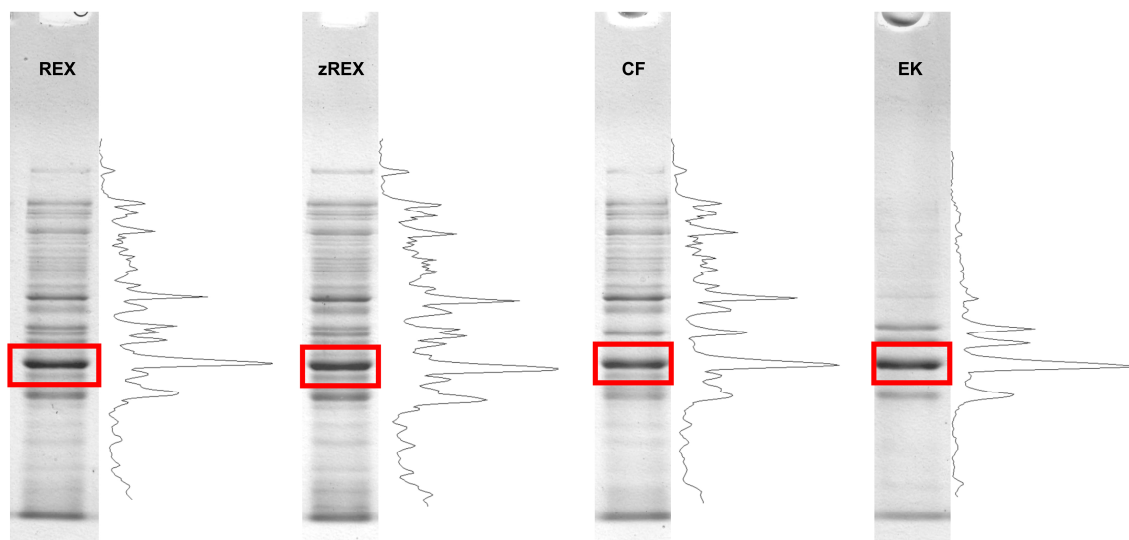


Abbildung 3-5: Analyse subzellulärer Fraktionen von IPTG-induziertem *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 auf das Vorhandensein von rekombinantem CoxF.

Nach Aufschluss induziert gewachsener Zellen von *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 wurde mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese die subzelluläre Verteilung von CoxF in den verschiedenen Fraktionen analysiert (A). Rohextrakt (REX) wurde zunächst niedertourig zentrifugiert (Kap. 2.11). Der Überstand (zellfreier Rohextrakt, zREX) wurde abgenommen, das Sediment mit den Einschlusskörpern (EK) erneut in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 resuspendiert. Des Weiteren konnte durch Ultrazentrifugation aus dem zellfreien Rohextrakt eine lösliche cytoplasmatische Fraktion (CF) gewonnen werden (Kap. 2.11). Von jeder Fraktion wurden jeweils 10 µg auf ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen und die enthaltenen Proteine elektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 2.17). Das Gel wurde mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt und der Gehalt von CoxF in den jeweiligen Fraktionen videodensitometrisch bestimmt (B) (Kap. 2.23).

Wie bereits unter Kap. 3.3 beschrieben, betrug der Anteil von CoxF am Gesamtzellprotein 34,96 %. Die densitometrische Auswertung des Gehalts an CoxF im Rohextrakt (REX, Abb. 3-5) lieferte mit 32,41 % einen vergleichbaren Wert. Nach niedertouriger Zentrifugation konnte für CoxF ein Gehalt von 21,12 % am Gesamtprotein des zellfreien Rohextraktes (zREX) ermittelt werden, während der Anteil im Sediment als Einschlusskörper (EK, Abb. 3-5) 32,0 % betrug. Der Anteil von löslichem CoxF im Cytoplasma konnte videodensitometrisch zu 20,1 % bestimmt werden. Die Analyse der verschiedenen Fraktionen, die im Rahmen des Zellaufschlusses und der Aufarbeitung der Extrakte erhalten werden konnten, zeigte somit, dass rekombinantes CoxF in *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 sowohl partikulär in Form von Einschlusskörpern als auch in löslicher Form gebildet wird. Beide Fraktionen bieten somit Ansatzpunkte für die Aufreinigung von CoxF. Mithilfe eines Molekulargewichtsstandards konnte für das rekombinante CoxF eine Größe von 30,290 kDa ermittelt werden, was eine Abweichung von nur 3,2 % von der nach der Gensequenz errechneten Größe von 29,346 kDa bedeutet.

3.5 Spezifische Immunoglobulin G-Antikörper zur Detektion von homologem und rekombinantem CoxF

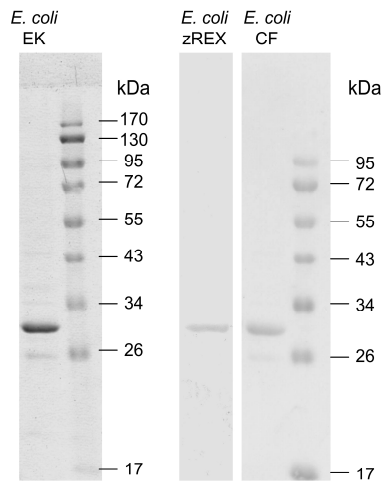
Für die Detektion von CoxF sowohl im homologen System (*O. carboxidovorans* OM5) als auch im heterologen System (*E. coli* AD494(DE3)/pSL1) sollten spezifische polyklonale Immunoglobulin G-Antikörper produziert werden. Mit Hilfe dieser sollte CoxF in Extrakten von *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 und *O. carboxidovorans* OM5 als auch in den Fraktionen von Saccharosedichtegradienten detektiert werden. Als Antigen für die Immunisierung diente rekombinantes CoxF aus Einschlusskörpern von *E. coli* AD494(DE3)/pSL1. Um ein möglichst reines CoxF-Polypeptid zu erhalten, wurden die Einschlusskörper einer zweimaligen präparativen SDS-PAGE unterzogen und das Protein schließlich aus dem Polyacrylamid-Gel eluiert (vgl. Kap. 2.17 und 2.20). Durch Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz konnte im Vorfeld die eindeutige Identität des Polypeptids bestimmt werden. Gereinigtes CoxF aus Einschlusskörpern wurde mittels Western-Blotting auf eine PVDF-Membran übertragen (Abb. 3-6, A Bahn „*E. coli* EK“) und über Edman-Abbau die Abfolge der ersten zehn N-terminalen Aminosäuren bestimmt. Das erhaltene Resultat wurde mit der von *coxF* abgeleiteten Aminosäure-Sequenz verglichen und ermöglichte eine eindeutige Identifizierung des gereinigten CoxF (Abb. 3-6, B).

Die Produktion der Immunseren wurde von der Firma Eurogentec durchgeführt (Kap. 2.20). Durch die elektrophoretische Auftrennung von Rohextrakt von induziertem *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 und Western-Blotting wurde die Spezifität der erhaltenen Seren getestet. Da die immunisierten Kaninchen im Zuge ihrer Käfighaltung u. U. auch Mikroorganismen wie *E. coli* mit der Nahrung aufnehmen, war nicht auszuschließen, dass es bereits vor der Immunisierung mit CoxF zu einer Immunantwort gegen *E. coli* gekommen war. Daher wurden die erhaltenen Immunseren mit Rohextrakt von nicht induziertem *E. coli* inkubiert, um unspezifische, gegen *E. coli* gerichtete Antikörper abzusättigen (Kap. 2.21).

Immunoblots zeigten, dass die produzierten Anti-CoxF-IgGs spezifisch rekombinantes CoxF in zellfreiem Rohextrakt sowie auch im Cytoplasma von *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 detektierten (Abb. 3-6, A, Bahn „*E. coli* zREX“ bzw. „*E. coli* CF“). Darüber hinaus konnte auch homologes CoxF im Rohextrakt und Cytoplasma von *O. carboxidovorans* OM5 detektiert werden (Abb. 3-6, A, Bahn „*O. c.* zREX“ bzw. „*O. c.* CF“). Hier wurde mit den Immunseren auf den PVDF-Membranen eine konkrete Proteinbande spezifisch detektiert, welche ein apparentes Molekulargewicht von 30,87 kDa aufwies und damit mit dem rechnerischen Molekulargewicht des aus der Sequenz von *coxF* abgeleiteten Polypeptids vergleichbar war. Die gegen das rekombinante CoxF gebildeten Immunglobulin G - Antikörper waren somit auch in der Lage, CoxF im homologen System spezifisch zu detektieren. Die Tatsache, dass hier teilweise nur schwache Signale erhalten wurden, konnte darauf zurückgeführt werden, dass CoxF in *O. carboxidovorans* OM5 nur in geringen Mengen gebildet wird.

Mittels Affinitätschromatographie an Protein A wurden die IgG-Antikörper schließlich aufgereinigt (Kap. 2.21). Immunglobulin G-Antikörper besitzen eine hohe Affinität gegenüber Protein A und können somit mit ihrem F_C-Teil spezifisch an das Säulenmaterial binden. Beim Auftragen des Serums auf die Affinitätssäule wurde ein hoher Anteil an Proteinen zunächst wieder von der Säule gewaschen. Diese zeigten somit keine Affinität für Protein A. Das gebundene Protein, die IgG-Antikörper gegen CoxF, konnten bei niedrigem pH-Wert von der Säule eluiert werden (Abb. 3-6, D). Mittels Slot-Blot konnte im Verlauf der Affinitätschromatographie die Antigenizität der entsprechenden Fraktionen gegen CoxF bestätigt werden (Abb. 3-6, C). Die IgG enthaltenden Fraktionen wurden schließlich vereinigt, aufkonzentriert und auf neutralen pH-Wert umgepuffert.

A



B

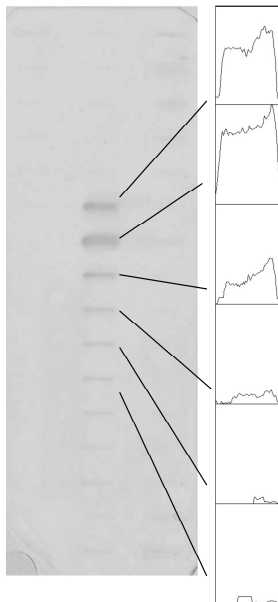
N-Terminus des rekombinanten Proteins,
bestimmt durch Edman-Abbau

M T P T P D V L D L

N-Terminus, abgeleitet aus der Gensequenz

M T P T P D V L D L

C



D

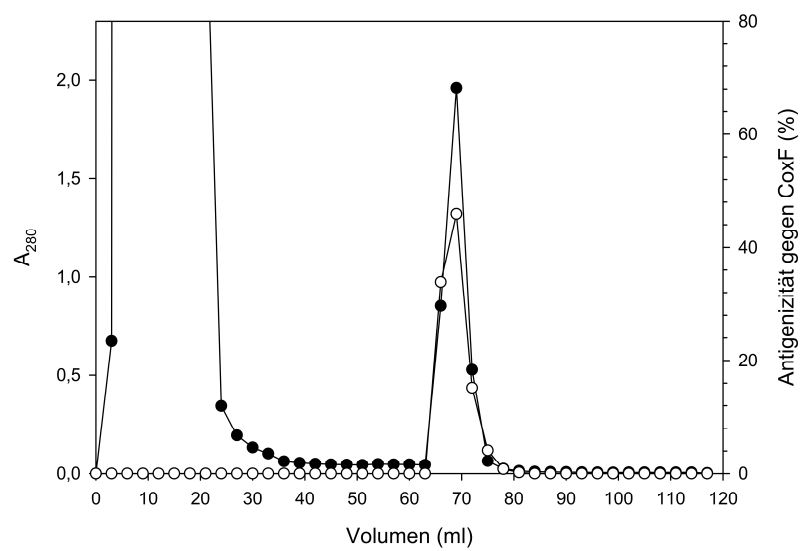


Abbildung 3-6: Produktion polyklonaler Immunoglobulin G - Antikörper gegen CoxF.

Für die Immunisierung wurde rekombinantes CoxF-Protein aus gewaschenen Einschlusskörpern von *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 verwendet (vgl. Kap. 2.14.1). Um hochreines Protein zu erhalten wurde das Protein einer zweimaligen denaturierenden PAGE (Kap. 2.17 und 2.20) unterzogen. Mittels Western-Blotting wurde ein Teil des rekombinanten Proteins auf eine PVDF-Membran transferiert (Kap. 2.18), mit Ponceau S angefärbt (A, Bahn „*E. coli* EK“, ca. 30 µg Protein) und die Identität schließlich über N-terminale Sequenzierung mittels Edman-Abbau bestätigt (B). Die hieraus erhaltene Sequenz der letzten zehn N-terminalen Aminosäuren wurde dabei mit der aus der vom Strukturgen abgeleiteten Sequenz verglichen.

Der überwiegende Anteil des rekombinanten Proteins wurde nach der zweimaligen PAGE aus dem Polyacrylamid-Gel eluiert und zur Immunisierung von Kaninchen zur Produktion von Anti-CoxF-IgG-Antikörpern verwendet (Kap. 2.20). Mittels denaturierender PAGE und anschließendem Western-Blotting wurde die Spezifität der erhaltenen Immunseren getestet (A). Dabei wurde einerseits die Antigenizität gegen rekombinantes CoxF in zellfreiem Rohextrakt und Cytoplasma von *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 getestet (A, Bahn „*E. coli* zREX“ bzw. „*E. coli* CF“, jeweils 30 µg Protein), als auch die Antigenizität gegen homologes CoxF in zellfreiem Rohextrakt und Cytoplasma von CO-chemolithoautotroph gewachsenem *O. carboxidovorans* OM5 (A, Bahn „*O. c.* zREX“ bzw. „*O. c.* CF“, jeweils 80 µg Protein). In allen Fällen konnte ein deutliches Signal detektiert werden, welches auch durch Mitführen eines Molekulargewichtsstandards (PageRuler Prestained, Fermentas) CoxF zugeordnet werden konnte.

Mittels Affinitätschromatographie an Protein A wurden die Anti-CoxF-Immunoglobulin G – Antikörper aus den Immunseren aufgereinigt (Kap. 2.21). In den einzelnen Fraktionen wurde die relative Proteinkonzentration durch Bestimmung der Absorption bei 280 nm ermittelt (D, ○) sowie mittels Slot-Blot die Antigenizität gegen CoxF (C und D, ●). Die hierbei auftretenden Signale wurden dabei videodensitometrisch ausgewertet (C) (Kap. 2.23) und dem Proteinprofil gegenübergestellt.

3.6 CoxF bildet keine inter- oder intramolekularen Disulfidbrücken aus

CoxF besitzt als Monomer eine molekulare Masse von 29,346 kDa (Kap. 3.1). Häufig bilden Proteine über Cystein-Reste allerdings intermolekulare Disulfid-Brücken aus, was zur Ausbildung von größeren Komplexen führt. Zur Stabilisierung der Protein-Struktur können darüber hinaus auch intramolekulare Disulfid-Brücken gebildet werden, wodurch das Protein in seiner Konformation gehalten wird (Creighton 1997).

Mittels SDS-PAGE kann ermittelt werden, ob ein Protein intra- oder intermolekulare Disulfidbrücken aufweist. Werden intermolekulare Disulfidbrücken gebildet, so entstehen kovalent-verknüpfte, oligomere Strukturen, die während einer SDS-PAGE ohne Zusatz reduzierender Reagenzien erhalten bleiben. Die Polypeptide zeigen in diesem Fall eine in Bezug auf die molekulare Masse verringerte Mobilität. Liegen intramolekulare

Disulfidbrücken in einem Polypeptid vor, so kann das Protein im Zuge der SDS-PAGE nicht vollständig entfaltet werden, was zu einer kompakteren Konformation des SDS-Proteinkomplexes führt (Allore und Barber 1984). Derartige Komplexe wandern während der Elektrophorese schneller als Proteine ohne intramolekulare Disulfidbrücken und zeigen dementsprechend ein geringeres apparentes Molekulargewicht. Durch Zugabe von reduzierenden Reagenzien (externe Thiole) wie 1,4-Dithiothreitol (DTT) oder β -Mercaptoethanol können Disulfidbrücken reduziert und dementsprechend gespalten werden, was zur Ausbildung monomerer Strukturen führt (De Beus et al. 2004; Pan und Carroll 2013).

Da CoxF vier Cysteine (Cysteine 58, 108, 130 und 153) besitzt, wäre auch hier die Ausbildung inter- oder intramolekularer Disulfidbrücken denkbar. So sind rechnerisch zehn verschiedene Cystin-Kombinationen zur Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken denkbar, sowie sechs verschiedene Kombinationen zur Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken. Die Ausbildung derartiger Disulfidbrücken würde zu einer sehr viel kompakteren Struktur führen, was sich in einer maßgeblich erhöhten Mobilität gegenüber reduziertem, monomeren CoxF äußern würde.

Das Vorliegen von Disulfidbrücken wurde sowohl im homologen als auch im heterologen System überprüft. Zellfreier Rohextrakt von *O. carboxidovorans* OM5 wurde mit reduzierendem als auch mit nicht-reduzierendem Probenauftragspuffer (mit bzw. ohne Zusatz von β -Mercaptoethanol) mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Kap. 2.17), die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert (Kap. 2.18) und mittels spezifischer Anti-CoxF-IgG-Antikörper detektiert (Abb. 3-7, Bahn 1 und 2). Zur Größenbestimmung wurde ein Molekulargewichtsstandard mitgeführt. Der Immunoblot zeigte, dass CoxF in beiden Ansätzen, also unter reduzierenden als auch unter nicht-reduzierenden Bedingungen, die gleiche Mobilität aufweist. Dies verdeutlicht, dass in authentischem CoxF keine intramolekularen Disulfidbrücken vorhanden sind. Das Fehlen von Banden mit geringerer Mobilität spricht ferner gegen das Auftreten von intermolekularen Disulfidbrücken zwischen CoxF-Monomeren. Auch eine Interaktion (bzw. kovalente Verknüpfung) von CoxF mit anderen Cystein-haltigen Proteinen über Disulfidbrücken kann ausgeschlossen werden.

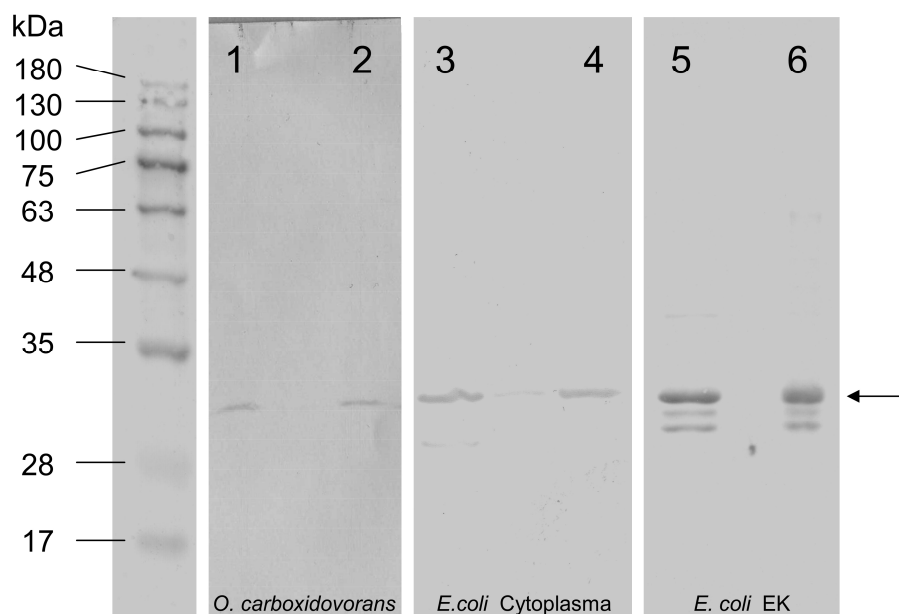


Abbildung 3-7: Mobilität des CoxF-Proteins bzw. dessen Bande in SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen.

Homologes und rekombinantes CoxF wurden unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen einer SDS-PAGE unterzogen und die aufgetrennten Proteine im Anschluss auf eine PVDF-Membran transferiert (Kap. 2.17 und 2.18). Mittels spezifischer Anti-CoxF-Immunglobulin G Antikörper wurde CoxF auf der Membran nachgewiesen (Kap. 2.22). Zur Untersuchung von homologem CoxF wurde Rohextrakt (80 µg pro Bahn) von *O. carboxidovorans* OM5 eingesetzt. Dieser wurde unter reduzierenden Bedingungen (Bahn 1) in 2 % SDS und 2 % β -Mercaptoethanol bzw. für nicht-reduzierende Bedingungen (Bahn 2) nur in 2 % SDS durch 5 min Kochen denaturiert. Für lösliches, rekombinantes CoxF wurde Cytoplasma (30 µg pro Bahn) aus *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 unter reduzierenden (Bahn 3) als auch nicht-reduzierenden Bedingungen (Bahn 4) getestet. Das Ergebnis für rekombinantes CoxF aus gewaschenen, solubilisierten Einschlusskörpern (10 µg pro Bahn) ist in den Bahnen 5 (reduzierend) und 6 (nicht-reduzierend) dargestellt.

CoxF wird in *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 rekombinant gebildet – sowohl als lösliches, cytoplasmatisches Protein als auch in Form von Einschlusskörpern (Kap. 3.4). In beiden Fällen war bisher unklar, ob das rekombinante CoxF auch in seiner natürlichen Konformation vorkommt. Es wäre hier denkbar, dass das Protein eventuell falsch gefaltet vorliegt und entgegen dem authentischen CoxF sehr wohl inter- oder intramolekulare Disulfidbrücken ausbildet. Zur Untersuchung dieses Sachverhalts wurden rückgefaltetes CoxF aus solubilisierten Einschlusskörpern und lösliches rekombinantes CoxF mit reduzierendem und nicht-reduzierendem Probenauftragspuffer versetzt und einer SDS-PAGE unterzogen. Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran mittels Western-Blotting wurde CoxF erneut mit spezifischen Anti-CoxF-IgG-Antikörpern detektiert (Abb. 3-7, Bahn 3 und 4 bzw. 5

und 6). Das rekombinante CoxF zeigt in beiden Fällen (reduzierende und nicht-reduzierende Bedingungen) als auch untereinander ein identisches Wanderungsverhalten. Sowohl lösliches als auch CoxF aus solubilisierten Einschlusskörpern zeigen die gleiche Mobilität, unabhängig von der Art des Probenauftragspuffers. Dies verdeutlicht, dass auch im rekombinanten CoxF keine intramolekularen Disulfidbrücken ausgebildet werden. Das Fehlen von detektierten Banden mit geringerer Mobilität bestätigt zudem, dass auch hier keine intermolekularen Disulfidbrücken vorliegen.

3.7 Translation der Cox-Proteine in *O. carboxidovorans* OM5

Um die Translation der Proteine CoxD, CoxE und CoxF in den entsprechenden Mutanten von *O. carboxidovorans* OM5 untersuchen zu können, wurden die jeweiligen zellfreien Rohextrakte mittels denaturierender PAGE aufgetrennt, die Proteine mittels Western-Blotting auf eine PVDF-Membran transferiert (Kap. 2.17 und 2.18) und CoxD, CoxE und CoxF mittels spezifischer IgG-Antikörper detektiert (Abb. 3-8).

Santiago et al. (1999) konnten zeigen, dass die *cox*-Gene in *O. carboxidovorans* unter chemolithoautotrophen Bedingungen in Gegenwart von CO als Induktor spezifisch transkribiert werden. Darüber hinaus konnten in der *coxD*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 Transkripte von *coxE* und *coxF* nachgewiesen werden (Pelzmann et al. 2009), sowie in der *coxE*-Mutante Transkripte von *coxD* und *coxF* (Staron 2008). Die spezifische Detektion von CoxD in den verschiedenen Rohextrakten ergab, dass das Polypeptid sowohl im Wildtyp als auch in den Mutantenstämmen E::km und F::km translatiert wird, was sich mit dem Vorhandensein an entsprechender mRNA deckt (Santiago et al. 1999; Staron 2008; Pelzmann et al. 2009). Das Fehlen von CoxD im Mutantenstamm D::km bestätigt die Inaktivierung durch Insertion der Kanamycin-Resistenzkassette.

CoxE und CoxF konnten überraschenderweise nur im Rohextrakt des Wildtyps detektiert werden. In den Mutanten D::km, E::km und F::km waren die beiden Polypeptide nicht vorhanden. Dies lässt auf eine gegenseitige Abhängigkeit der Cox-Proteine hinsichtlich ihrer Translation schließen. So wird CoxD für die Translation von CoxE und CoxF benötigt, CoxE zusätzlich für die Translation von CoxF und umgekehrt. Tab. 3-5 fasst die Translationsanalyse der Cox-Proteine im Wildtyp und den Mutanten von *O. carboxidovorans* OM5 zusammen.

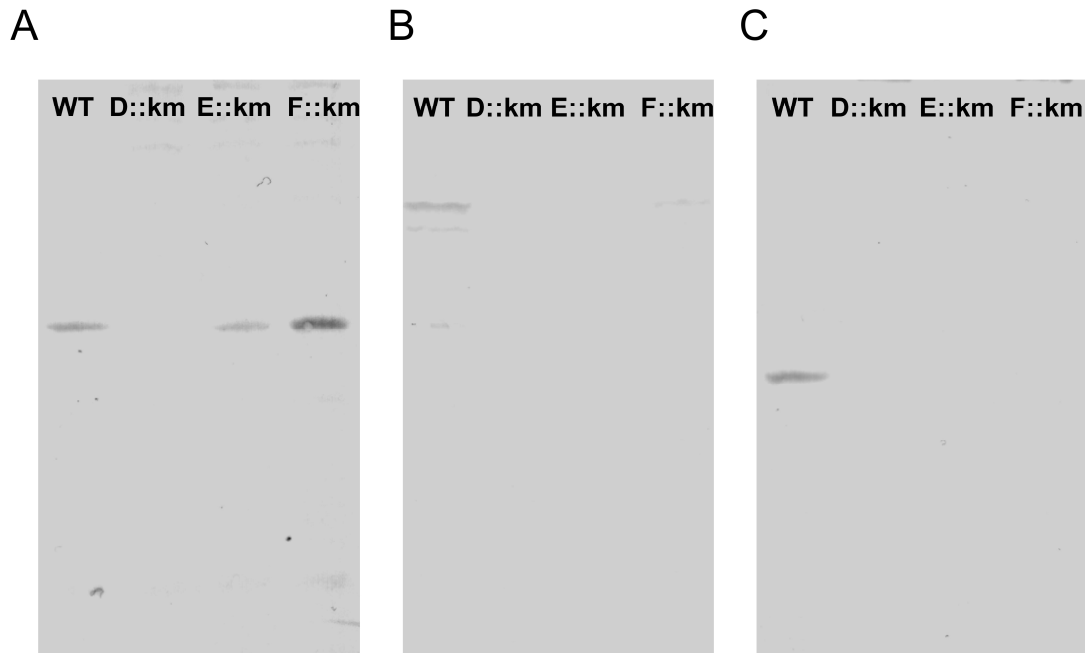


Abbildung 3-8: Translationsanalyse der Proteine CoxD, CoxE und CoxF in zellfreien Rohextrakten von *O. carboxidovorans* OM5 Wildtyp und der Insertionsmutanten D::km, E::km und F::km.

Die Anzucht der verschiedenen Stämme von *O. carboxidovorans* OM5) Wildtyp und Mutanten) erfolgte unter chemolithoautotrophen Bedingungen unter CO-induzierenden Bedingungen in einer Gas-Atmosphäre mit 30% H₂, 5% CO₂, 30% CO und 35% Luft (jeweils v/v). Zellfreie Rohextrakte wurden einer denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen (200 µg Protein pro Bahn) und die aufgetrennten Proteine im Anschluss mittels Western-Blotting auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Detektion der Proteine CoxD (A), CoxE (B) und CoxF (C) erfolgte mithilfe spezifischer IgG-Antikörper.

Tabelle 3-5: Translation der Polypeptide CoxD, CoxE und CoxF in *O. carboxidovorans* OM5 (Wildtyp und Mutanten).

Das Vorhandensein (+) von CoxD, CoxE und CoxF ist für die Rohextrakte von *O. carboxidovorans* OM Wildtyp und den Mutantenstämmen D::km, E::km und F::km angegeben.

	Wildtyp	D::km	E::km	F::km
CoxD	+	-	+	+
CoxE	+	-	-	-
CoxF	+	-	-	-

3.8 Subzelluläre Lokalisation der Cox-Proteine in *O. carboxidovorans* OM5: CoxF wird als lösliches Protein gebildet, während CoxD und CoxE membrangebunden erscheinen

Mittels Ultrazentrifugation von zellfreien Rohextrakten (zREX) von *O. carboxidovorans* OM5 wurden Membran-Fraktionen (M) und cytoplasmatische Fraktionen (CF) gewonnen, in denen die Lokalisation der Cox-Polypeptide untersucht wurde. Proben von zellfreiem Rohextrakt, Cytoplasma und Membranen wurden mittels denaturierender PAGE aufgetrennt (80 µg Protein pro Bahn) und die Proteinbanden auf eine PVDF-Membran transferiert. Über spezifische IgG-Antikörper wurden CoxD, CoxE und CoxF schließlich detektiert. Zusätzlich zu diesem Identitätsnachweis konnte über einen entsprechenden Standard das Molekulargewicht der detektierten Proteine bestimmt werden und mit den bekannten Werten der Cox-Proteine verglichen werden.

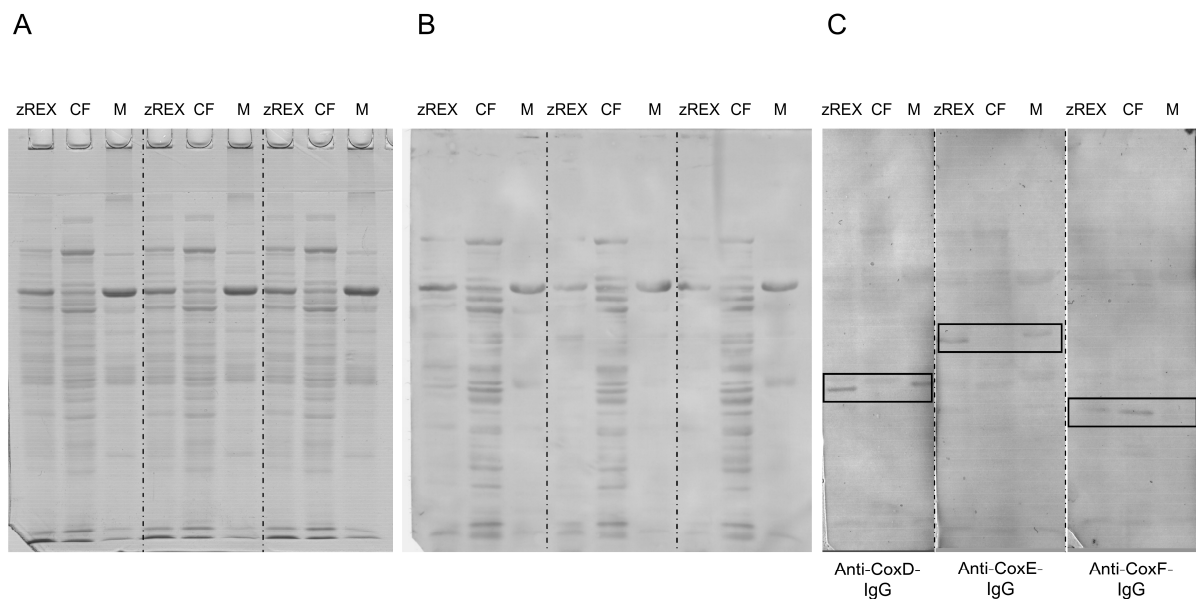


Abbildung 3-9: Subzelluläre Lokalisierung der Proteine CoxD, CoxE und CoxF in *O. carboxidovorans* OM5.

Zellfreier Rohextrakt (zREX), die lösliche cytoplasmatische (CF) und die Membranfraktion (M) vom Wildtyp von *O. carboxidovorans* OM5 wurden mittels denaturierender PAGE aufgetrennt (A) und die Proteine im Anschluss mittels Western-Blotting auf eine PVDF-Membran transferiert (B). Nach erfolgtem Transfer konnte das Polyacrylamid-Gel mit Coomassie Brilliant Blau und die PVDF-Membran mit Ponceau S gefärbt werden, um Proteinbanden sichtbar zu machen. Für die immunologische Detektion wurde die PVDF-Membran entfärbt und CoxD, CoxE und CoxF mit spezifischen Anti-Cox-IgGs detektiert (C).

Der zellfreie Rohextrakt diente als Kontrolle und erwartungsgemäß konnten hier alle drei Cox-Proteine detektiert werden. CoxD und CoxE konnten in der löslichen Fraktion nicht nachgewiesen werden, nur in der Membran-Fraktion war ein Nachweis möglich, während CoxF ausschließlich im Cytoplasma detektiert wurde (Abb. 3-9). Dies stimmt zudem mit der Vorhersage von CoxF als lösliches Protein überein.

3.9 Zentrifugation in Saccharosedichtegradienten zur Analyse von Translation, subzellulärer Lokalisierung und Oligomerisierung der Cox-Proteine

Mittels Saccharosedichtegradienten-Zentrifugationen wurde sowohl die subzelluläre Lokalisation der Cox-Proteine ermittelt (zur Bestätigung der Ergebnisse von PAGE und Immunoblot, Kap. 3.8) als auch das Vorkommen unterschiedlicher oligomerer Zustände. Die Durchführung und Auswertung erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. A. Pelzmann (Lehrstuhl Mikrobiologie, Universität Bayreuth). Die Dichtegradienten-Zentrifugation wurde in diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten (10 - 80 % Saccharose in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2) durchgeführt. Nach Übereinanderschichten der Saccharose-Lösungen und Linearisierung des Gradienten konnte die Probe aufgetragen werden. Das Volumen der Probe (zellfreier Rohextrakt, Cytoplasma oder Membranen) betrug dabei maximal 5 % des Gesamtvolumens des Gradienten (84 ml). Während der Ultrazentrifugation werden lösliche Bestandteile des Rohextraktes mit einer entsprechend geringeren Dichte von partikulären Bestandteilen abgetrennt, die eine höhere Dichte aufweisen. Nach der Zentrifugation wurden sämtliche Fraktionen der Gradienten hinsichtlich ihres Saccharose-Gehaltes (Kap. 2.25.1) und ihrer Proteinkonzentration (Kap. 2.16) analysiert. Der Nachweis der Cox-Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE und Western-Blotting mit anschließender immunologischer Detektion mit spezifischen IgG-Antikörpern (Kap. 2.17, 2.18 und 2.22). Da die Farbintensität der entsprechenden Banden von der Menge der Cox-Proteine abhängt, kann durch videodensitometrische Auswertung der relative Anteil der Cox-Proteine in einer Fraktion ermittelt werden. Dieser ergibt sich aus dem Verhältnis der Farbintensität einer Fraktion zur Gesamtintensität aller Fraktionen. Als Marker für den partikulären Bereich im Gradientenprofil wurde die Aktivität der membrangebundenen NADH-Dehydrogenase bestimmt, für den löslichen Bereich die Aktivität der cytoplasmatischen Malat-Dehydrogenase (Kap. 2.24.2). Eine Größenbestimmung der detektierten Cox-Proteine erfolgte

(soweit sinnvoll möglich) nach Schachmann (1959) mithilfe eines Referenzgradienten mit Markerproteinen.

Die Auftrennung und Analyse von zellfreiem Rohextrakt (4,0 ml mit 52,4 mg/ml) CO-chemolithoautotroph gewachsener Zellen von *O. carboxidovorans* OM5 (Wildtyp) mittels Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation ist in Abb. 3-10 dargestellt.

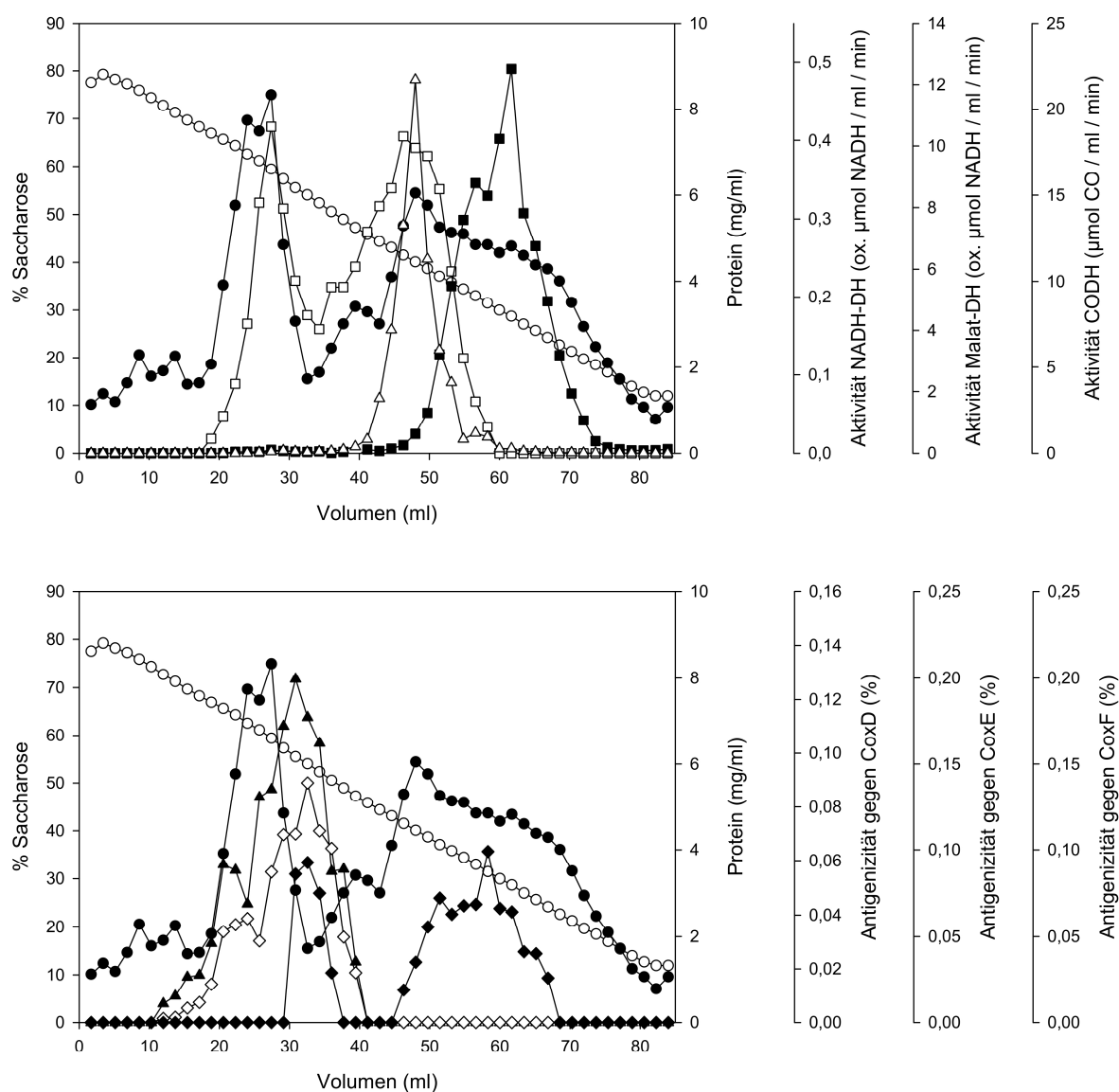


Abbildung 3-10: Subzelluläre Lokalisierung der Proteine CoxD, CoxE und CoxF in zellfreiem Rohextrakt von *O. carboxidovorans* OM5 (CO-chemolithoautotroph angezüchtet) mittels Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation.

Zellfreier Rohextrakt (4,0 ml) eines CO-chemolithoautotroph gewachsenen Wildtyps von *O. carboxidovorans* OM5 wurde auf einen linearen Saccharosedichtegradienten mit 10 - 80 % (w/v) Saccharose in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 aufgetragen. Durch Ultrazentrifugation wurden die Bestandteile des zellfreien Rohextraktes gemäß ihrer Dichte aufgetrennt. Im Anschluss wurde der Gradient abgepumpt, fraktioniert und zunächst die Saccharosekonzentration (○) refraktometrisch bestimmt (Kap. 2.25.1). Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (●) in jeder Fraktion (Kap. 2.16) wurde jeweils ein Volumen mit 80 µg mit dem entsprechenden Volumen an SDS-Kochpuffer versetzt, 5 min im Wasserbad gekocht und mittels denaturierender PAGE aufgetrennt (Kap. 2.17). Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (Kap. 2.18) konnten die Proteine CoxD (▲), CoxE (◇) und CoxF (◆) jeweils mit spezifischen Anti-Cox-IgG-Antikörpern detektiert werden (Kap. 2.22). Eine videodensitometrische Auswertung erlaubte die Bestimmung der relativen Proteinmengen (Kap. 2.23). Als Marker für den partikulären Bereich im Gradienten wurde die Aktivität der NADH-Dehydrogenase (□) in jeder Fraktion ermittelt, über die Aktivität der Malat-Dehydrogenase (■) konnte der Bereich löslichen Proteins bestimmt werden (Kap. 2.24.2). Ferner wurde in den Fraktionen die CO-oxidierende Aktivität (Δ) bestimmt (Kap. 2.24.1), die als Maß für das Vorhandensein von CO-Dehydrogenase dient und ebenfalls den Bereich löslichen Proteins aufzeigt.

Der Gradient mit zellfreiem Rohextrakt (Abb. 3-7) trennte sich im Proteinprofil (●) auf zwei Dichtebereiche auf, mit einem Saccharose-Gehalt von 68,3 bis 54,1 % bzw. 52,4 bis 13,0 %. Ersterer spiegelt den partikulären oder Membran-Bereich wider. Hier konnte auch die hauptsächliche NADH-oxidierende Aktivität der membrangebundenen NADH-Dehydrogenase (□) ermittelt werden (Maximum bei 59,4 % (w/v) Saccharose). Der zweite Dichtebereich kann als löslicher, cytoplasmatischer Bereich angesehen werden, was durch die NADH-oxidierende Aktivität der hier vorkommenden, cytoplasmatischen Malat-Dehydrogenase (■) bestätigt wird (Maximum bei 28,7 % (w/v) Saccharose). In diesem Bereich kann zusätzlich eine weitere NADH-oxidierende Aktivität gemessen werden, die auf eine weitere, lösliche NADH-Dehydrogenase hindeutet. Die Proteine CoxD (▲) und CoxE (Δ) konnten gemeinsam bei einem Saccharose-Gehalt von 72,8 bis 45,9 % (w/v) detektiert werden, was dem partikulären Bereich zuzuordnen ist. In diesem Bereich bei einer Saccharosekonzentration von 57,4 bis 49,0 % (w/v) konnte auch CoxF (◆) detektiert werden. Die drei Proteine zeigten im partikulären Bereich eine annähernde Koinzidenz ihrer Maxima. Dieses lag für CoxD bei 55,5 % (w/v) Saccharose, für CoxE und CoxF bei 54,1 % (w/v) Saccharose. CoxF konnte darüber hinaus im löslichen Milieu bei einem Saccharose-Gehalt von 43,1 bis 22,7 % (w/v) detektiert werden, mit Maxima bei 37,1 % (w/v) und 31,5 % (w/v)

Saccharose. CoxF wurde damit sowohl im partikulären als auch im löslichen Dichtebereich detektiert. In beiden Fällen handelt es sich allerdings um lösliches Protein. Dies konnte durch Saccharosedichtegradienten gezeigt werden, bei denen als Proben homogenisierte Membranen von *O. carboxidovorans* OM5 (Abb. 3-8) bzw. Cytoplasma (Abb. 3-9) aufgetragen wurden.

Um die subzelluläre Lokalisierung der Proteine CoxD, CoxE und CoxF zu bestätigen, wurden gewaschene Membranen aus CO-chemolithoautotroph gewachsenem *O. carboxidovorans* OM5 mittels Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation analysiert. Der Hauptanteil an Protein (●) war hier in einem Dichtebereich von 70,1 bis 45,5 % (w/v) Saccharose zu finden, was dem partikulären oder Membran-Bereich des zREX-Gradienten (Abb. 3-7) entspricht. Der zweite Dichtebereich des zREX-Gradienten, der den Dichtebereich des löslichen Proteins widerspiegelt, ist im Membran-Gradienten nicht vorhanden. Erwartungsgemäß konnte auch keine NADH-oxidierende Aktivität der cytoplasmatischen Malat-Dehydrogenase detektiert werden. Bei Saccharosekonzentrationen von 66,5 bis 32,5 % (w/v) konnte allerdings für die membrangebundene NADH-Dehydrogenase, NADH-oxidierende Aktivität ermittelt werden (□).

In diesem Membran-Gradienten konnten nur CoxD (■) und CoxE (Δ) detektiert werden. CoxD zeigte Signale in einem Dichtebereich von 62,0 bis 13,0 % (w/v) Saccharose, mit Maxima bei 54,3 und 50,8 % (w/v). Die Detektion von CoxD im Dichtebereich von 38,9 bis 13,0 % (w/v) könnte auf eine „Verschleppung“ von Protein aus dem partikulären Dichtebereich zurückzuführen sein. CoxE konnte zwischen 71,8 und 58,6 % (w/v) Saccharose detektiert werden und zeigte zwei Detektionsmaxima bei 68,2 und 62,0 % (w/v). Diese Saccharose-Gehalte für CoxD und CoxE entsprachen weitestgehend denen im Gradienten des zellfreien Rohextraktes. Signale für CoxF wurden nicht erhalten.

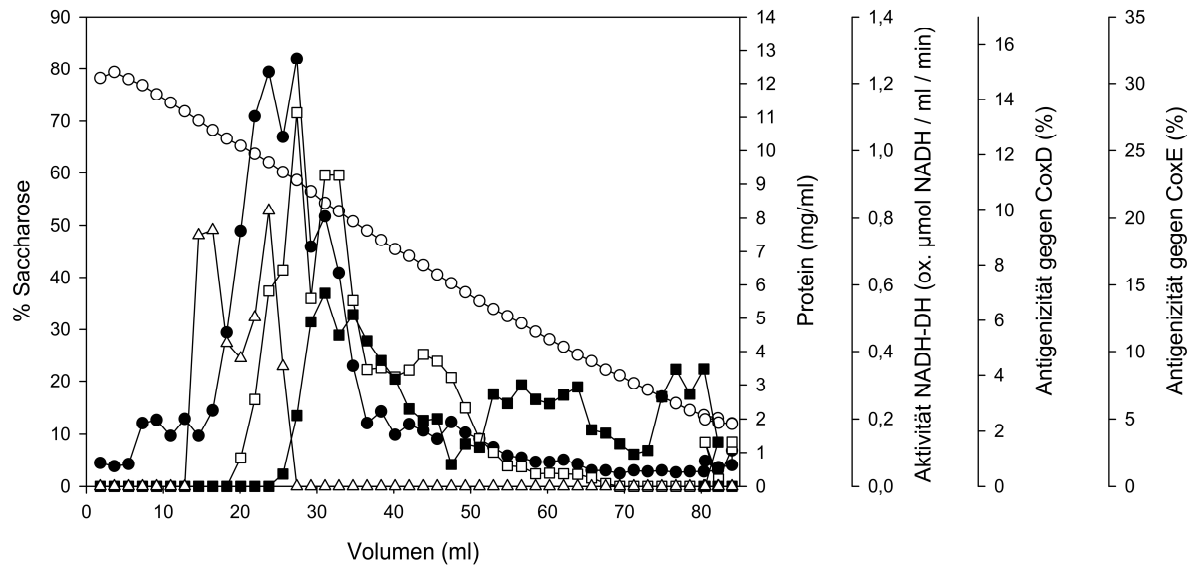


Abbildung 3-11: Subzelluläre Lokalisierung der Proteine CoxD, CoxE und CoxF in der Membranfraktion von *O. carboxidovorans* OM5 (CO-chemolithoautotroph angezüchtet) mittels Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation.

Die nach Ultrazentrifugation (Kap. 2.11) von zellfreiem Rohextrakt (CO-chemolithoautotroph gewachsener Wildtyp von *O. carboxidovorans* OM5) erhaltene Membranfraktion wurde auf einen linearen Saccharosedichtegradienten mit 10 - 80 % (w/v) Saccharose in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 aufgetragen. Durch erneute Ultrazentrifugation bei 100.000 x g, 42 h, 4 °C wurden die verschiedenen Bestandteile der Membranfraktion gemäß ihrer Dichte aufgetrennt. Der Gradient wurde im Anschluss abgepumpt, fraktioniert und zunächst die Saccharosekonzentration (○) refraktometrisch bestimmt (Kap. 2.25.1). Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (●) in jeder Fraktion (Kap. 2.16) wurde jeweils ein Volumen mit entsprechend 80 μg Protein mit SDS-Kochpuffer versetzt, 5 min im Wasserbad gekocht und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Kap. 2.17). Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran über Western-Blotting (Kap. 2-18) konnten die Proteine CoxD (■) und CoxE (Δ) jeweils mit spezifischen Anti-Cox-IgG-Antikörpern detektiert werden (Kap. 2.22). Die Dichtebereiche der erhaltenen Signale entsprachen denen des zREX-Gradienten (Abb. 3-7). Eine videodensitometrische Auswertung erlaubte die Bestimmung der relativen Proteinmengen (Kap. 2.23). CoxF konnte nicht detektiert werden. In jeder Fraktion wurde außerdem die NADH-oxidierende Aktivität bestimmt bzw. die NADH-oxidierende Aktivität in Gegenwart von Malat (Kap. 2.24.2). Erstere konnte in einem Dichtebereich ermittelt werden, in welchem im zREX-Gradienten bereits NADH-oxidierende Aktivität detektiert wurde. Die gemessene Aktivität ist damit der membrangebundenen NADH-Dehydrogenase zuzuordnen (□). NADH-oxidierende Aktivität in Gegenwart von Malat, welche auf das Vorhandensein der cytoplasmatischen Malat-Dehydrogenase hindeuten würde, konnte nicht gemessen werden.

In einer weiteren Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation wurde als Probe Cytoplasma von CO-chemolithoautotroph gewachsenem *O. carboxidovorans* OM5 aufgetragen (4,0 ml mit 32,0 mg/ml). Nach Auswertung konnte das hauptsächliche Protein (●) in einem Dichtebereich von 51,4 bis 12,2 % (w/v) Saccharose bestimmt werden. Dies entspricht weitestgehend auch dem Dichtebereich des löslichen Proteins im zREX-Gradienten (Abb. 3-7). Die im Bereich 40,4 bis 15,8 % (w/v) ausgemachte NADH-oxidierende Aktivität in Gegenwart von Malat ist auf die cytoplasmatische Malat-Dehydrogenase (□) zurückzuführen. Das Aktivitätsmaximum liegt bei 31,2 % (w/v) Saccharose. Im Dichtebereich von 66,0 bis 52,0 % (w/v), also jenem Bereich, der im zREX-Gradient dem partikulären Protein zuzuordnen wäre, konnte keine NADH-oxidierende Aktivität gemessen werden, was das Fehlen der membrangebundenen NADH-Dehydrogenase bestätigt.

CoxD und CoxE konnten im Cytoplasma-Gradienten nicht detektiert werden. Nur CoxF konnte mittels Immunoblot nachgewiesen werden (■). Dieses erschien bei der Detektion erneut in Form von zwei hauptsächlichen Peaks in einem Dichtebereich von 61,4 bis 40,4 % (w/v) sowie 38,9 bis 24,0 % (w/v) Saccharose. Detektionsmaxima lagen bei 58,1, 53,1, 32,8 und 30,0 % (w/v) Saccharose. Dies entspricht vom Saccharose-Gehalt den Peaks im zREX-Gradienten. Aus diesen Ergebnissen kann somit geschlossen werden, dass der CoxF-Peak im partikulären Bereich des zREX-Gradienten auf lösliches CoxF zurückzuführen ist, welches sich aufgrund seiner oligomeren Zustände und deren Größe bei höheren Saccharosekonzentrationen anordnet. Dass es sich um kein membrangebundenes CoxF handelt, kann dahingehend mit der Untersuchung der subzellulären Lokalisierung (Kap. 3.8) in Einklang gebracht werden, dass CoxF zwar im zREX-Gradienten im partikulären Bereich vorzufinden ist, aber bei Ultrazentrifugationen zur Trennung von Membranen und Cytoplasma nicht mit den Membranen sedimentiert bzw. im Zuge des Waschens aus der Membranfraktion abgereichert wird.

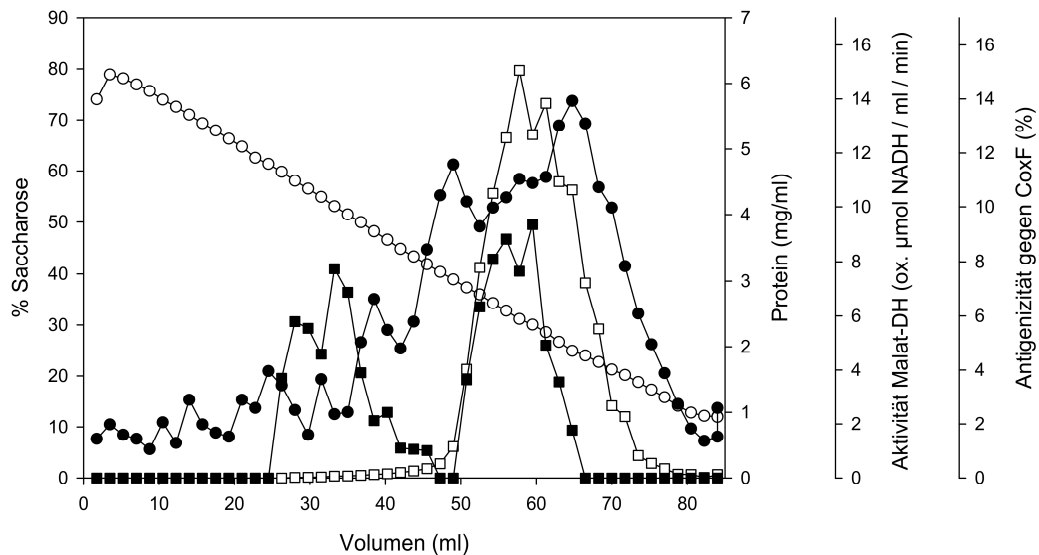


Abbildung 3-12: Subzelluläre Lokalisierung der Proteine CoxD, CoxE und CoxF in der cytoplasmatischen Fraktion von *O. carboxidovorans* OM5 (CO-chemolithoautotroph angezüchtet) mittels Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation.

Die mittels Ultrazentrifugation (Kap. 2.11) von zellfreiem Rohextrakt erhaltene cytoplasmatische Fraktion (4,0 ml mit 32,0 mg/ml) wurde auf einen linearen Saccharosedichtegradienten mit 10 - 80 % (w/v) Saccharose in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 aufgetragen. Durch erneute Ultrazentrifugation bei 100.000 x g, 42 h, 4 °C wurden die Bestandteile des Cytoplasmas entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt. Nach erfolgter Zentrifugation wurde der Gradient abgepumpt, fraktioniert und zunächst die Saccharosekonzentration (○) refraktometrisch bestimmt (Kap. 2.25.1). Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (●) in jeder Fraktion (Kap. 2.16) wurde jeweils ein Volumen mit entsprechend 80 μg Protein mit SDS-Kochpuffer versetzt, 5 min im Wasserbad gekocht und mittels denaturierender PAGE aufgetrennt (Kap. 2.17). Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran über Western-Blot (Kap. 2-18) konnte CoxF (■) mit spezifischen Anti-Cox-IgG-Antikörpern in zwei Dichtebereichen detektiert, welche jenen Bereichen des zREX-Gradienten entsprachen (Abb. 3-7). Eine videodensitometrische Auswertung erlaubte die Bestimmung der relativen Proteinmengen (Kap. 2.23). CoxD und CoxE konnten über Immunoblot nicht detektiert werden, was darauf schließen lässt, dass diese Proteine partikulär und nicht membrangebunden in *O. carboxidivorans* OM5 vorkommen. Jede Fraktion des Gradienten wurde ferner auf NADH-oxidierende Aktivität bzw. NADH-oxidierende Aktivität in Gegenwart von Malat getestet (Kap. 2.24.2). Letztere konnte in einem Bereich detektiert werden, der jenem Dichtebereich mit NADH-oxidierender Aktivität des zREX-Gradienten entsprach (Abb. 3-7), so dass es sich hierbei um die Aktivität der cytoplasmatischen Malat-Dehydrogenase (□) handelt. Bei höheren Saccharosekonzentrationen konnte keine NADH-oxidierende Aktivität gemessen werden, was auf das Fehlen der membrangebundenen NADH-Dehydrogenase hinweist.

Die Proteine CoxD, CoxE und CoxF bildeten in den Profilen der Saccharosedichtegradienten keine einheitlichen Protein-Peaks. Es wurden z. T. mehrere Maxima und teilweise Schultern detektiert. Tab. 3-6 gibt eine Übersicht über die Bereiche, in denen die Proteine CoxD, CoxE und CoxF detektiert wurden. Da CoxD und CoxE membrangebunden detektiert wurden, lässt sich keine Aussage treffen, ob es sich bei den erhaltenen Signalen im zREX- bzw. Membran-Gradienten um Oligomere der jeweiligen Polypeptide handelt. CoxF erscheint dagegen als lösliches Protein, so dass durch Mitführen eines Referenzgradienten mit Markerproteinen die molekulare Masse jedes Maximums und jeder Schulter nach Schachmann (1959) berechnet werden konnte (Kap. 2.25.2). Die erhaltenen Werte sind ebenfalls in Tab. 3-6 aufgeführt.

Tabelle 3-6: Detektion von CoxD, CoxE und CoxF in Saccharosedichtegradienten von *O. carboxidovorans* OM5.

Zellfreier Rohextrakt, gewaschene Membranen und Cytoplasma des Wildtyps von *O. carboxidovorans* OM5 (CO-chemolithoautotroph gewachsen) wurden Saccharosedichtegradienten-Zentrifugationen unterzogen (Kap. 2.25.1) und CoxD, CoxE und CoxF nach Abpumpen mit spezifischen IgG-Antikörpern detektiert. Angegeben sind die jeweiligen Dichtebereiche, in denen die Cox-Proteine detektiert wurden sowie die ermittelten Maxima und Schultern (S) im Profil. Da es sich bei CoxF um ein lösliches Protein handelt, wurde nach Schachmann (1959) zusätzlich der Grad der Oligomerisierung ermittelt (durch Berechnung der molekularen Massen).

	Gradient zREX, Wildtyp		Gradient Membranen, Wildtyp		Gradient Cytoplasma, Wildtyp	
	Dichtebereich % Sacch.	Maxima % Sacch.	Dichtebereich % Sacch.	Maxima % Sacch.	Dichtebereich % Sacch.	Maxima % Sacch.
CoxD	72,8 – 45,9	65,7 55,5 49,0	62,0 – 38,9	54,3 50,8		
CoxE	72,8 – 45,9	62,6 54,1	71,8 – 58,6	68,2 62,0		
CoxF	57,4 – 49,0	54,1 14x			61,4 – 40,4	58,1 16x 53,1 14x 46,6 12x
	43,1 – 22,7	37,1 9x 34,4 (S) 8x 31,5 6x 28,7 (S) 5x 25,7 (S) 4x			38,9 – 24,0	32,8 7x 30,0 6x 26,7 (S) 4x

Maisel et al. (2012) konnten zeigen, dass es sich bei CoxD um ein peripheres Membranprotein handelt, welches in Gegenwart von zweiwertigen Kationen wie Mg^{2+} und Ca^{2+} mit der Cytoplasma-Membran interagiert bzw. an diese Membran auch gebunden werden kann. Zudem besitzt CoxD auch keinen Membran-Anker oder Transmembran-Helices, so dass die Bindung von CoxD an Membranen eher elektrostatischer Natur ist (Maisel et al. 2012). Diese Interaktion konnte durch die Zugabe von anionischen Detergentien wie N-Lauroylsarkosin und SDS zumindest teilweise aufgehoben werden, so dass oligomere Strukturen von CoxD ins Cytoplasma freigesetzt wurden. Nach Schachmann (1959) konnte die molekulare Masse der Oligomere berechnet werden. Ein ähnlicher Sachverhalt trifft eventuell auch für CoxE zu. Zur Untersuchung wurde ein Extrakt nach Triton-Aufschluss (Kap. 2.13) auf einen Saccharosedichtegradienten (10 - 80 % (w/v) Saccharose) aufgetragen. Im Zuge dieses Aufschlusses wird durch das zugegebene Na_2 -EDTA zunächst die Zellwand durch Komplexierung zweiwertiger Kationen destabilisiert. Die Zugabe von 2 % (v/v) Triton führt schließlich zur Permeabilisierung der Zellwand. Die Zelle ‚läuft‘ aus und dabei werden ihre löslichen Komponenten freigesetzt. Durch niedertourige Zentrifugation kann die leere Hülle der Zelle („Ghost“), die sämtliche Zellwandkomponenten sowie Membransysteme noch enthält, vom Extrakt der freigesetzten (löslichen) Proteine abgetrennt werden. Dieses „Pseudo-Cytoplasma“ wurde auf einen Saccharosedichtegradienten aufgeschichtet. Das Probenvolumen betrug 4,0 ml mit einer Proteinkonzentration von 35,5 mg/ml. Nach Ultrazentrifugation und Abpumpen des Gradienten wurden die jeweiligen Fraktionen zunächst auf Saccharosekonzentration (○) (Kap. 2.25.1) und Proteinkonzentration (●) (Kap. 2.16) analysiert (Abb. 3-10). Letztere zeigt einen Verlauf, der dem des zREX-Gradienten ähnelt. Allerdings verteilt sich das Protein auf vier größere Dichtebereiche mit 73,7 bis 57,4 % (w/v), 55,7 bis 47,2 % (w/v), 45,8 bis 36,3 % (w/v) und 34,7 bis 15,6 % (w/v) Saccharose. Für letzteren Bereich kann die Hauptaktivität der cytoplasmatischen Malat-Dehydrogenase ermittelt werden (Maximum bei 31,5 % (w/v) Saccharose), was mit dem Cytoplasma- und zREX-Gradienten vergleichbar ist (Abb. 3-12 bzw. 3-10). Die ersteren beiden Dichtebereiche sind vom Proteinprofil in dieser Art nicht im Cytoplasma-Gradienten zu finden. Das Auftreten dieser Maxima kann darauf zurückgeführt werden, dass auch größere lösliche Proteine oder Proteinkomplexe aus der Zelle ausgetreten sind, die sonst bei der Gewinnung von „echtem“ Cytoplasma im Zuge der Ultrazentrifugation mit den Membranen sedimentiert wären. Die Abtrennung der Zellhüllen und weiteren, eventuell entstandenen Zelltrümmern erfolgte nach Triton-Inkubation durch eine niedertourige

Zentrifugation, wodurch auch größere Proteinkomponenten im Extrakt verblieben und sich im Gradienten gemäß ihrer Dichte aufgetrennt haben.

Dass es sich in den Dichtebereichen von 73,7 bis 57,4 % (w/v) und 55,7 bis 47,2 % (w/v) Saccharose um lösliches und nicht um membrangebundenes Protein handelt, zeigt das Fehlen einer NADH-oxidierenden Aktivität (\square) in diesem Bereich. Es ist somit keine membrangebundene NADH-Dehydrogenase in diesen Dichtebereichen vorhanden. Eine entsprechende Aktivität kann wie im zREX- und Cytoplasma-Gradienten nur im Dichtebereich von 42,7 bis 20,5 % (w/v) Saccharose ermittelt werden. Diese Aktivität scheint erneut auf eine cytoplasmatische NADH-Dehydrogenase oder ein Enzym mit vergleichbarer Aktivität zurückzuführen sein.

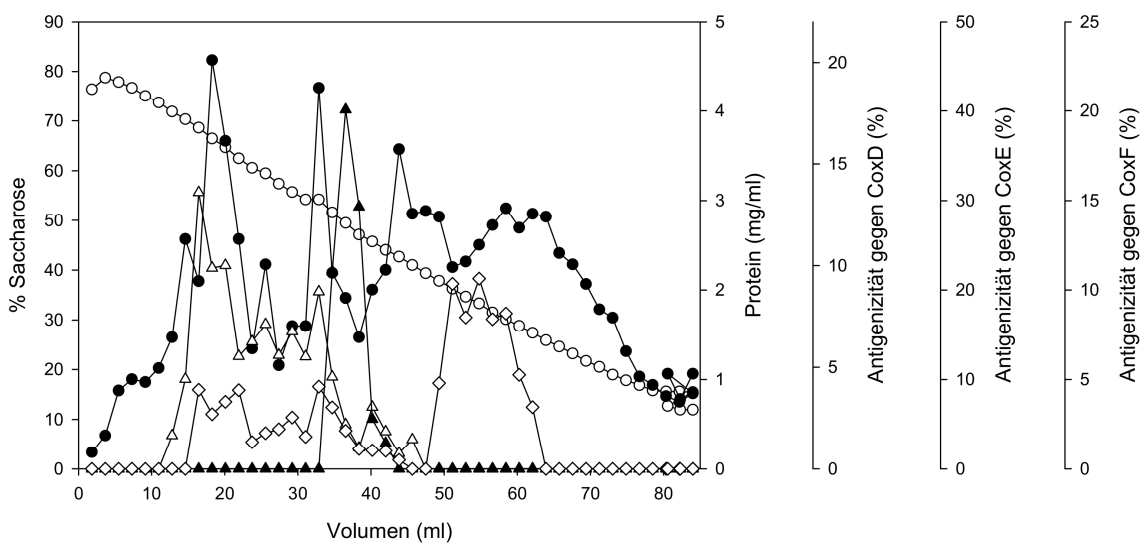
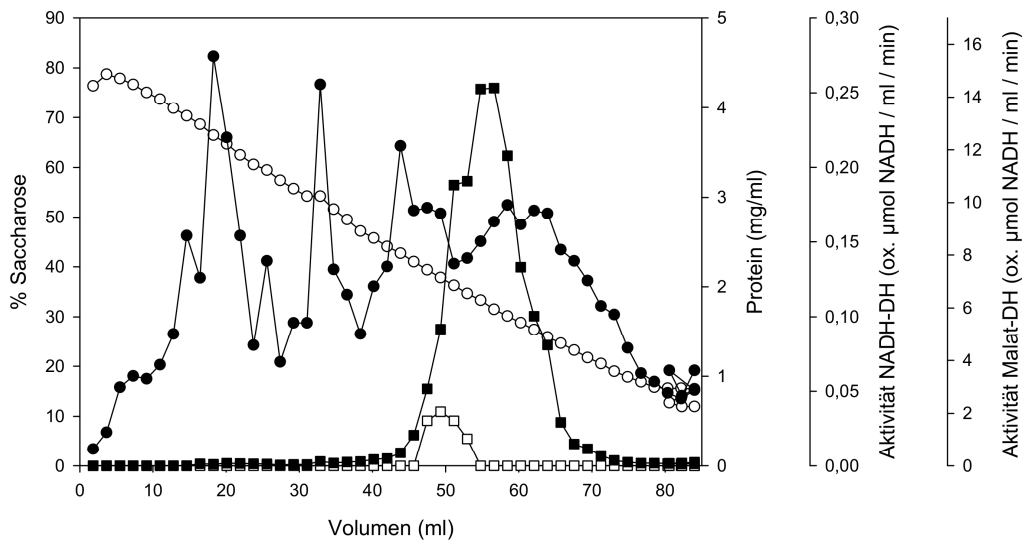


Abbildung 3-13: Saccharosedichtegradient zur subzellulären Lokalisierung der Proteine CoxD, CoxE und CoxF im löslichen Extrakt von *O. carboxidovorans* OM5 (CO-chemolithoautotroph angezüchtet) nach Triton-Aufschluss.

Zellmaterial eines CO-chemolithoautotroph gewachsenen Wildtyps von *O. carboxidovorans* OM5 (32,29 g in 48,44 ml 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ pH 7,2) wurde mit dem Detergenz Triton X-100 aufgeschlossen (Kap. 2.13). Im Zuge der Permeabilisierung der Zellwand konnten lösliche Proteine diese passieren. Zellhüllen und eventuell entstandene Zelltrümmer konnten durch niedertourige Zentrifugation (10.000 rpm, 30 min, 4 °C) abgetrennt werden. 4 ml des erhaltenen Extrakts wurden schließlich auf einen linearen Saccharosedichtegradienten mit 10 - 80 (w/v) Saccharose in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 aufgetragen. Durch Ultrazentrifugation wurden die Bestandteile gemäß ihrer Dichte aufgetrennt. Im Anschluss an die Ultrazentrifugation wurde der Gradient abgepumpt, fraktioniert und die Saccharosekonzentration (○) refraktometrisch bestimmt (Kap. 2.25.1). Anschließend wurde die Proteinkonzentration (●) in jeder Fraktion (Kap. 2.16) bestimmt und jeweils ein Volumen mit 80 µg mit dem entsprechenden Volumen an SDS-Kochpuffer versetzt, 5 min im Wasserbad gekocht und mittels denaturierender PAGE aufgetrennt (Kap. 2.17). Nach Transferierung der Proteine auf eine PVDF-Membran (Kap. 2.18) konnten die Proteine CoxD (Δ), CoxE (▲) und CoxF (◇) jeweils mit spezifischen Anti-Cox-IgG-Antikörpern detektiert werden (Kap. 2.22). Eine videodensitometrische Auswertung erlaubte die Bestimmung der relativen Proteinmengen (Kap. 2.23). In allen Fraktionen wurde sowohl die Aktivität der membrangebundenen NADH-Dehydrogenase (□) als auch die Aktivität der cytoplasmatischen Malat-Dehydrogenase (■) bestimmt (Kap. 2.24.2). Letztere dient als Marker für lösliches Protein und konnte erwartungsgemäß auch in einem Dichtebereich detektiert werden, der mit dem Cytoplasma- oder zREX-Gradienten vergleichbar ist. Das Fehlen von NADH-oxidierender Aktivität in höheren Dichtebereichen kann als das Fehlen der membrangebundenen NADH-Dehydrogenase gedeutet werden. Das Proteinprofil basiert somit auf löslichem Protein, welches im Zuge der Permeabilisierung die Zellwand passieren konnte.

Nach Auftrennung von Cytoplasma mittels Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation konnte CoxD nicht detektiert werden (Abb. 3-12). Eine Detektion ist allerdings im Extrakt nach Triton-Aufschluss möglich (Abb. 3-13, Δ). Die mittels SDS-PAGE und nachfolgendem Immunoblot (Kap. 2.17, 2.18 und 2.22) erhaltenen Signale korrelieren mit dem Proteinprofil im Dichtebereich von 73,7 bis 47,2 % (w/v) Saccharose und weisen zahlreiche Maxima auf (vgl. Tab. 3-7). Es kann angenommen werden, dass die Zugabe von Triton zu den Zellen von *O. carboxidovorans* OM5 die Interaktion von CoxD mit der Cytoplasma-Membran stört bzw. aufhebt, so dass CoxD als lösliches Protein in den Extrakt übergang und nicht mit den Membran-Systemen und Zellhüllen abzentrifugiert wurde. Der Dichtebereich, in dem CoxD detektiert werden konnte, lässt zudem darauf schließen, dass es sich um höhere oligomere Strukturen von CoxD handeln muss – auf die Oligomerisierung selbst, wie sie von Maisel et al. (2012) nachgewiesen wurde, hatte die Zugabe von Triton als Detergenz offenbar keinen

Einfluss. So entsprechen die detektierten CoxD-Maxima 8-meren bis 18-meren (vgl. Tab. 3-7).

CoxE (▲) konnte in einem Dichtebereich von 54,2 bis 42,7 % (w/v) Saccharose detektiert werden und zeigte ein konkretes Maximum bei 49,5 % (w/v) Saccharose. Dies entspricht einer molekularen Masse von 379,6 kDa – das 8,6-fache der molekularen Masse von CoxE mit 44,235 kDa. Im Membran-Gradienten konnte CoxE in einem vergleichbaren Dichtebereich detektiert werden (Abb. 3-11). Die Bindung von CoxE an die Membran könnte analog zu CoxD über elektrostatische Wechselwirkungen erfolgen – CoxE besitzt lt. Sequenzanalyse keinen Membran-Anker oder Transmembran-Helices – oder durch Bindung an CoxD im Zuge einer Komplex-Bildung. Eine derartige Bindung könnte beispielsweise über die Von Willebrand Faktor A-Domäne von CoxE erfolgen (Dr. A. Pelzmann, persönliche Mitteilung). CoxD besitzt das dazu komplementäre Binde-Motiv R²⁵⁹AE (Maisel 2012), was eine Interaktion beider Proteine ermöglicht. Somit könnte CoxE einerseits analog zu CoxD von der Membran gelöst worden sein, oder die Interaktion mit CoxD könnte gestört worden sein, was zur Auflösung des CoxD-CoxE-Komplexes geführt hat.

CoxF (◇) wurde im Saccharosedichtegradienten des Triton-Extraktes in zwei Dichtebereichen von 70,3 bis 41,0 % (w/v) und 39,4 bis 25,9 % (w/v) Saccharose detektiert. Für beide Bereiche konnten verschiedene Maxima ermittelt werden, denen in Tab. 3-7 die jeweiligen oligomeren Strukturen zugeordnet sind. Diese entsprechen dem im zREX- und Cytoplasma-Gradienten detektierten CoxF. Die Oligomerisierung scheint wie bei CoxD und CoxE durch das Detergenz Triton nicht gestört zu werden. Somit führte die Permeabilisierung der Zellwand dazu, dass das lösliche CoxF (in Form verschieden großer Oligomere) in den Extrakt übergang und dementsprechend auch detektiert werden konnte.

Um gezielt lösliches Protein im Rahmen des Triton-Aufschlusses zu erhalten, wurde nach der Inkubation mit Triton X-100 niedertourig zentrifugiert. Für eine weitere Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation wurde auf diesen Zentrifugationsschritt verzichtet und 4 ml der Zellsuspension (nach Triton-Behandlung) direkt auf einen Saccharosedichtegradienten geschichtet. Nach Ultrazentrifugation wurde der Gradient abgepumpt und die einzelnen Fraktionen (2 ml) analysiert (Abb. 3-14).

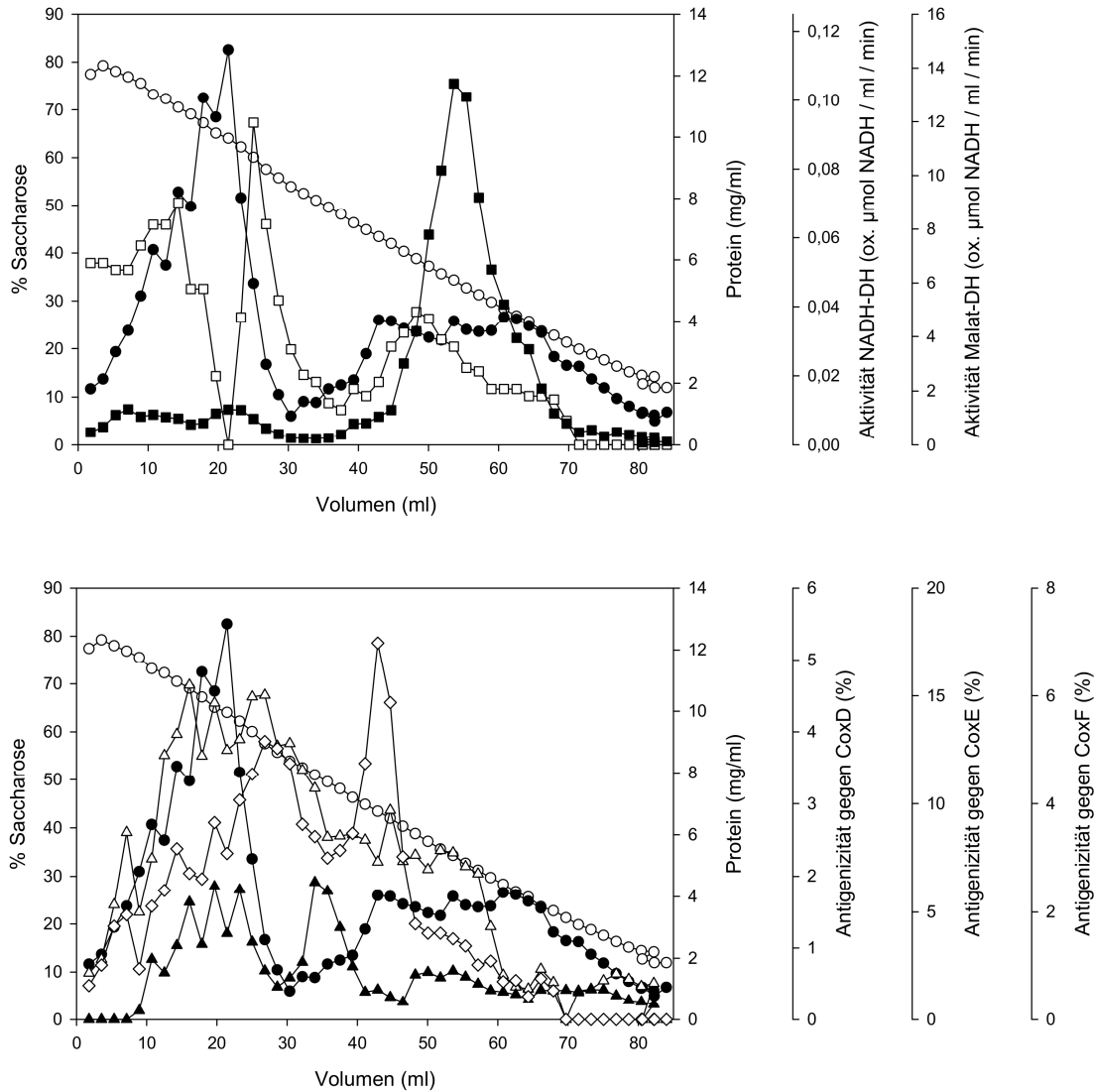


Abbildung 3-14: Saccharosedichtegradient zur subzellulären Lokalisierung der Proteine CoxD, CoxE und CoxF im Rohextrakt nach Triton-Behandlung.

O. carboxidovorans OM5 (Wildtyp) wurde CO-chemolithoautotroph angezüchtet und Zellmaterial (32,29 g in 48,44 ml 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ pH 7,2 resuspendiert) mit dem Detergenz Triton X100 versetzt (Kap. 2.13). Durch die Behandlung mit Triton X100 kommt es zur Permeabilisierung der Zellwand, so dass lösliche Proteine diese passieren können. Der erhaltene „Rohextrakt“ wurde ohne weitere Zentrifugation auf einen linearen Saccharosedichtegradienten mit 80 - 10 % (w/v) Saccharose in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 aufgetragen. Nach Ultrazentrifugation wurde der Gradient abgepumpt, fraktioniert der Gehalt an Saccharose (\circ) (Kap. 2.25.1) sowie auch die Proteinkonzentration (\bullet) bestimmt (Kap. 2.16). 80 μg einer jeden Fraktion wurden mit einem entsprechenden Volumen an SDS-Kochpuffer versetzt, 5 min im Wasserbad gekocht und mittels denaturierender PAGE aufgetrennt (Kap. 2.17). Die Proteine wurden anschließend mittels Western-Blotting auf eine PVDF-Membran transferiert (Kap. 2.18) und CoxD (Δ), CoxE (\blacktriangle) und CoxF (\diamond) mit spezifischen Anti-Cox-IgG-Antikörpern jeweils detektiert (Kap. 2.22). Die relativen Proteinmengen konnten durch videodensitometrische Auswertung der PVDF-Membranen bestimmt werden (Kap. 2.23). Als Marker für den partikulären Bereich wurde die NADH-oxidierende Aktivität der NADH-Dehydrogenase (\square) bestimmt. Die erhaltenen

Aktivitätsmaxima geben zum einen den Bereich vollständig erhaltener Zellen bei höheren Saccharosekonzentrationen wieder als auch einen Bereich, in dem Zellhüllen („Ghosts“) zu finden sind. Zusätzlich wurde die NADH-oxidierende Aktivität in Gegenwart von Malat bestimmt (Kap. 2.24.2). Hierüber kann die cytoplasmatische Malat-Dehydrogenase (■) nachgewiesen werden und somit der Bereich des löslichen Proteins, welches im Zuge der Triton-Behandlung die Zellwand passieren konnte.

Nach Bestimmung der Saccharosekonzentration (○) in den jeweiligen Fraktionen (Kap. 2.25.1) wurde zunächst der Proteingehalt (●) bestimmt (Kap. 2.16). Hier zeigt sich wie beim zREX-Gradienten, dass sich das zelluläre Protein auf zwei Dichtebereiche von 77,5 bis 53,9 % (w/v) und 52,5 bis 14,2 % (w/v) Saccharose auftrennt. Ersterer Bereich beinhaltet partikuläres bzw. Membran-Protein. In diesem Dichtebereich kann auch eine hohe NADH-oxidierende Aktivität nachgewiesen werden, was auf die membrangebundene NADH-Dehydrogenase (□) zurückzuführen ist. Deren Aktivität kann bei sehr hohen Saccharosekonzentrationen sowohl im Bereich von 77,5 bis 64,0 % (w/v) als auch im Bereich von 64,0 bis 48,1 % (w/v) nachgewiesen werden (Maxima bei 70,5 bzw. 60,0 % (w/v) Saccharose). Zudem ist in diesem Bereich die Proteinkonzentration recht hoch und bildet im Diagramm kleinere Maxima aus. Diese Beobachtungen können damit erklärt werden, dass im Zuge der Inkubation mit Triton-X-100 nicht alle Zellen vollständig permeabilisiert wurden und ein gewisser Anteil intakt geblieben sein muss. Während der Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation wandern diese nicht-aufgeschlossenen Zellen bis an den Grund des Zentrifugenröhrchens und sind demnach bei einer hohen Saccharosekonzentration zu finden. In diesen Zellen ist dementsprechend auch die membrangebundene NADH-Dehydrogenase zu finden, was sich in der gemessenen Aktivität widerspiegelt. Um den Bereich löslichen Proteins zu erfassen, welches im Zuge des Triton-Aufschlusses freigesetzt wurde, konnte die NADH-oxidierende Aktivität in Gegenwart von Malat bestimmt werden (Kap. 2.24.2). Die auf diese Weise bestimmte Malat-Dehydrogenase (■) hatte ihr Maximum bei einer Saccharose-Konzentration von 34,3 % (w/v) Saccharose. Zwei kleinere Maxima konnten im Bereich 77,5 bis 69,1 % (w/v) und 67,3 bis 52,5 % (w/v) Saccharose detektiert werden. Ersteres kann erneut auf nicht-permeabilisierte, intakte Zellen zurückgeführt werden, in denen die cytoplasmatische Malat-Dehydrogenase noch vorliegt. Der zweite Bereich stellt eine Restaktivität in den Hüllen der ausgelaufenen Zellen dar. Mittels spezifischer Immunoglobulin G-Antikörper wurden die Proteine CoxD (Δ), CoxE (▲) und CoxF (◇) detektiert (Kap. 2.22).

CoxD (Δ) konnte über einen großen Bereich des Gradienten verteilt detektiert werden (77,5 bis 25,7 % (w/v) Saccharose). Die Haupt-Maxima lagen allerdings bei 65,1 und 57,5 % (w/v) Saccharose, was jenen Dichtebereichen zuzuordnen ist, die intakte Zellen oder Zellhüllen enthalten. Dies lässt darauf schließen, dass CoxD als membrangebundenes Protein teilweise in den Zellhüllen verblieben ist. Dass zusätzlich eine Detektion bis weit in den Bereich des löslichen Proteins möglich war, kann erneut darauf zurückgeführt werden, dass das Detergenz Triton X-100 die Interaktion von CoxD mit der Cytoplasma-Membran stört, was zur Ablösung des Proteins führen könnte.

CoxE (\blacktriangle) kann hauptsächlich in einem Dichtebereich von 75,6 bis 44,9 % (w/v) Saccharose detektiert werden, was dem Bereich nicht aufgeschlossener Zellen bzw. dem Bereich von ausgelaufenen Zellhüllen („Ghosts“) entspricht, in denen die Membransysteme noch vorhanden sind. Letzteres ist mit dem zREX-Gradienten vergleichbar (Abb. 3-10), in dem CoxE als membrangebundenes Protein detektiert wurde. Die schwache Detektion im Bereich löslichen Proteins kann erneut darauf zurückgeführt werden, dass das Detergenz Triton X-100 in geringem Umfang die Interaktion des CoxE-Polypeptides (oder dessen Oligomere) mit der Cytoplasma-Membran aufgehoben hat und somit CoxE in die lösliche Fraktion freigesetzt wurde.

CoxF (\diamond) kann in zwei Dichtebereichen mit Saccharose-Konzentrationen von 77,5 bis 49,6 % (w/v) und 48,1 bis 21,3 % (w/v) Saccharose detektiert werden. Da es sich um lösliches Protein bzw. lösliche Proteinkomplexe handelt, kann davon ausgegangen werden, dass CoxF im Zuge der Triton-Behandlung die Cytoplasma-Membran passieren konnte und aus der Zelle ausgetreten ist. Die ermittelten Detektionsmaxima können rein rechnerisch einer Vielzahl von Oligomeren (3-mer bis 25-mer) zugeordnet werden.

Tabelle 3-7: Detektion von CoxD, CoxE und CoxF in Saccharosedichtegradienten von Triton-Extrakten aus *O. carboxidovorans* OM5.

Zellmaterial eines CO-chemolithoautotroph gewachsenen Wildtyps von *O. carboxidovorans* OM5 wurde mit dem Detergenz Triton X-100 aufgeschlossen (Kap. 2.13). Der erhaltene Extrakt wurde entweder direkt auf einen linearen Saccharosedichtegradienten aufgetragen oder nach niedertouriger Zentrifugation (10.000 rpm, 30 min, 4 °C), um Zellhüllen und eventuell entstandene Zelltrümmer abzutrennen. Die Proteine CoxD, CoxE und CoxF wurden nach Abpumpen mithilfe spezifischer IgG-Antikörper detektiert (Kap. 2.22). Angegeben sind die jeweiligen Dichtebereiche, in denen die Cox-Proteine detektiert wurden sowie die ermittelten Maxima und Schultern (S) im Profil. Zusätzlich wurde (sofern sinnvoll) der Oligomerisierungsgrad durch Berechnung der molekularen Massen (nach Schachmann 1959) ermittelt.

	Gradient „Pseudo-Cytoplasma“, Wildtyp		Gradient Triton-Rohextrakt, Wildtyp	
	Dichtebereich % Sacch.	Maxima % Sacch.	Dichtebereich % Sacch.	Maxima % Sacch.
CoxD	73,7 – 47,2	68,6 18x 64,7 16x 59,5 14x 55,7 13x 54,2 12,5x 45,8 10x 41,0 8x	77,5 – 25,7	76,9 22x 69,1 19x 65,1 17x 57,5 14x 42,0 9x
CoxE	54,2 – 42,7	49,5 9x	75,6 – 44,9	73,2 15x 69,1 14x 65,1 13x 62,2 12x 51,0 9x
CoxF	70,3 – 41,0	68,6 21x 62,5 18x 55,7 16x 54,2 14x	77,5 – 49,6	76,9 25x 73,2 (S) 23x 70,5 22x 65,1 20x 57,5 16x
	39,4 – 25,9	36,3 8x 33,3 7x 30,1 6x 27,4 (S) 4x	48,1 – 21,3	43,4 10x 29,7 5x 26,8 4x 23,6 3x

Um die CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante aufzureinigen und charakterisieren zu können, wurde *O. carboxidovorans* OM5 F::km unter CO-induzierenden Bedingungen mit $H_2/CO_2/CO/O_2$ angezüchtet (Kap. 2.7.1). Um zu überprüfen, ob diese Wachstumsbedingungen gegenüber dem CO-chemolithoautotrophen Wachstum einen Einfluss auf die Expression und Oligomerisierung der Proteine CoxD, CoxE und CoxF ausüben, wurde der Wildtyp von *O. carboxidovorans* OM5 ebenfalls unter einer $H_2/CO_2/CO/O_2$ -Atmosphäre angezüchtet und der nach Zellaufschluss erhaltene Rohextrakt in analoger Weise einer Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation (10 - 80 % (w/v) Saccharose) unterzogen. Das Volumen der Probe betrug 4,5 ml mit einer Konzentration von 44,36 mg/ml. Nach Ultrazentrifugation wurde der Gradient erneut zu Fraktionen mit je 2 ml Volumen abgepumpt (Kap. 2.25.1) und zunächst die Saccharose- (○) und Proteinkonzentration (●) in den verschiedenen Fraktionen bestimmt (Abb. 3-15).

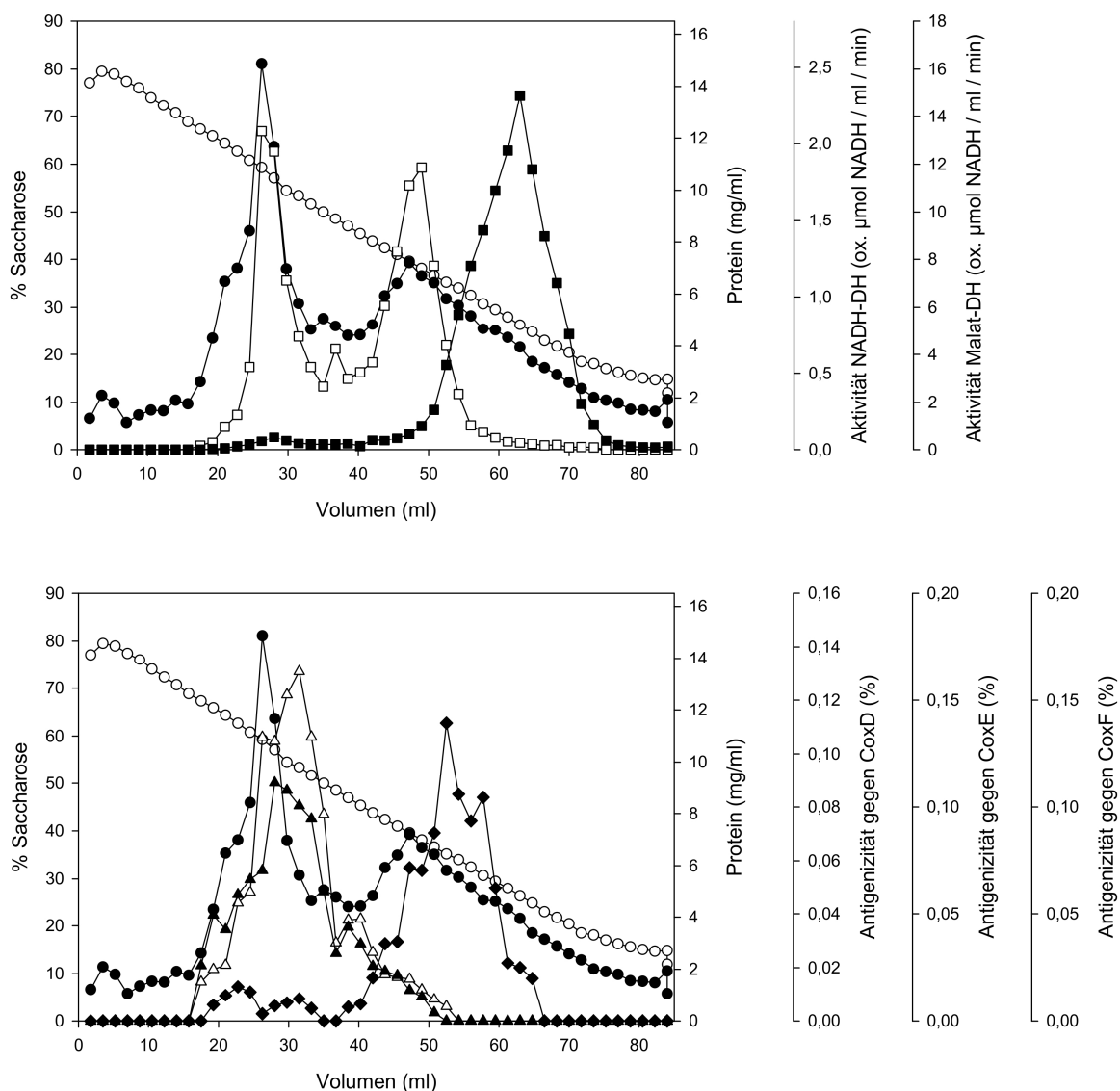


Abbildung 3-15: Subzelluläre Lokalisierung der Proteine CoxD, CoxE und CoxF in zellfreiem Rohextrakt von *O. carboxidovorans* OM5 (angezüchtet unter CO-induzierenden Bedingungen) mittels Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation.

Zellfreier Rohextrakt (4,5 ml) eines unter $H_2/CO_2/CO/O_2$ gewachsenen Wildtyps von *O. carboxidovorans* OM5 wurde auf einen linearen Saccharosedichtegradienten mit 10 - 80 % (w/v) Saccharose in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 aufgetragen. Im Rahmen der Ultrazentrifugation wurden die Komponenten des zellfreien Rohextraktes gemäß ihrer Dichte aufgetrennt. Anschließend wurde der Gradient abgepumpt, der Gehalt an Saccharose (○) refraktometrisch bestimmt (Kap. 2.25.1) sowie auch die Proteinkonzentration (●) in jeder Fraktion ermittelt (Kap. 2.16). Ein entsprechendes Volumen mit 80 µg Protein einer jeden Fraktion wurde mit SDS-Kochpuffer versetzt, 5 min im Wasserbad gekocht und mittels denaturierender PAGE aufgetrennt (Kap. 2.17). Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran mittels Western-Blotting (Kap. 2.18) ließen sich die Proteine CoxD (Δ), CoxE (▲) und CoxF (◆) jeweils mit spezifischen Anti-Cox-IgG-Antikörpern detektieren (Kap. 2.22). Eine videodensitometrische Auswertung erlaubte die Bestimmung der relativen Proteinmengen (Kap. 2.23). Als Marker für den partikulären Bereich bzw. Membran-Bereich im Gradienten wurde die Aktivität von NADH-Dehydrogenase (□) in jeder Fraktion ermittelt, über die Aktivität der Malat-Dehydrogenase (■) konnte der Dichtebereich des löslichen Proteins erfasst werden (Kap. 2.24.2).

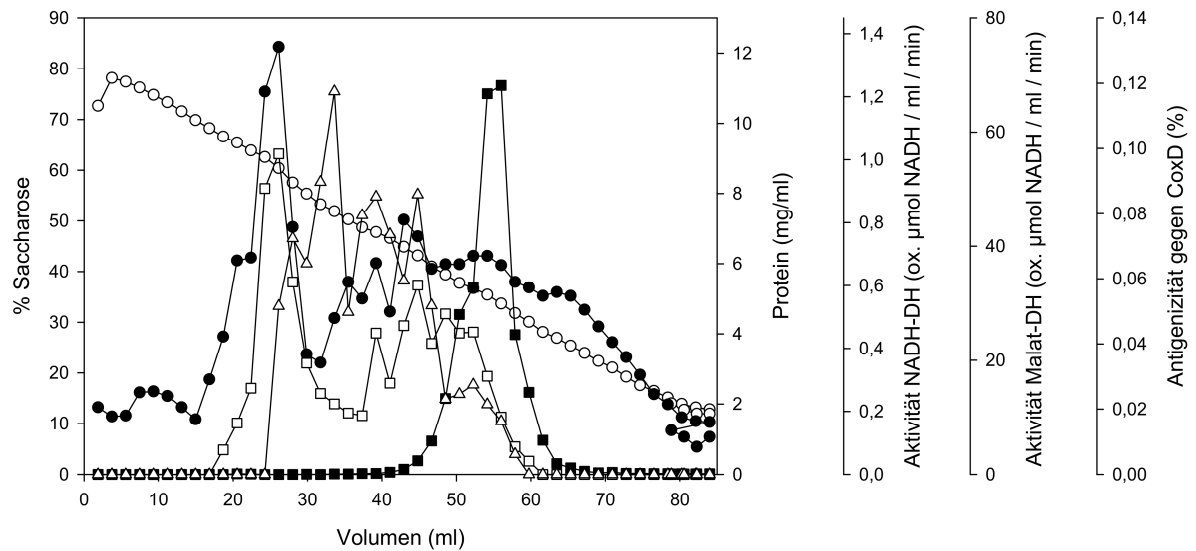
Die Analyse des Gradienten zeigt, dass die unterschiedlichen Wachstumsbedingungen keinerlei Einfluss auf die Verteilung des Proteins sowie auf die Detektion der Proteine CoxD, CoxE und CoxF haben. Wie im zREX-Gradienten CO-chemolithoautotroph gewachsener Zellen konzentriert sich das Protein (●) in zwei Dichtebereiche von 68,9 bis 47,0 % (w/v) und 45,3 bis 15,6 % (w/v) Saccharose. Im ersteren Bereich kann auch NADH-oxidierende Aktivität und somit die NADH-Dehydrogenase (□) detektiert werden. Wie im zREX-Gradienten CO-chemolithoautotroph gewachsener Zellen kann NADH-oxidierende Aktivität zudem in einem Dichtebereich gemessen werden, der den Bereich des löslichen Proteins zuzuschreiben ist. Hier kann dementsprechend auch von einer weiteren löslichen NADH-Dehydrogenase ausgegangen werden. Dass der zweite Dichtebereich lösliches Protein enthält, kann durch die NADH-oxidierende Aktivität der cytoplasmatischen Malat-Dehydrogenase (■) (Maximum bei 26,3 % (w/v)) bestätigt werden.

Wie bereits zuvor wurde CoxD (Δ) im Dichtebereich der partikulären Proteine detektiert und kann als membrangebunden angesehen werden. Das Protein besaß Maxima bei 59,3, 53,5 und 45,3 % (w/v) sowie Schultern bei 65,9 und 62,7 % (w/v) Saccharose. CoxE (▲) zeigt einen sehr ähnlichen Verlauf. Das Polypeptid kann im selben Dichtebereich detektiert werden und zeigt Maxima bei 65,9, 57,1 und 47,0 % (w/v) Saccharose. Schultern konnten bei 60,8 und 51,7 % (w/v) Saccharose detektiert werden. Damit ergeben sich in der

Detektion von CoxE erneut Koinzidenzen zu CoxD, was eine mögliche Interaktion und damit eine Komplexbildung beider Proteine bestätigen könnte. CoxF (◆) wird zu einem Großteil im Dichtebereich des löslichen Proteins detektiert. Die Maxima bei 39,6, 35,2 und 30,7 % (w/v) können 9-meren, 8-meren und 6-meren zugeordnet werden, die Schultern bei 42,4 und 26,3 % (w/v) Saccharose 10-meren bzw. 4-meren (vgl. Tab. 3-8). Zusätzlich konnte CoxF auch zu geringen Anteilen im partikulären Bereich des Gradienten bestimmt werden. Die beiden Maxima bei 62,7 und 53,4 % (w/v) Saccharose deuten auf 18-mere und 15-mere hin.

Zur weiteren Untersuchung der Translation, der subzellulären Lokalisation und der Oligomerisierung der Proteine CoxD, CoxE und CoxF wurde zellfreier Rohextrakt von *O. carboxidovorans* OM5 E::km und F::km jeweils einer Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation unterzogen (Abb. 3-16; A: E::km, B: F::km). Mit den beiden Gradienten sollte insbesondere ermittelt werden, inwieweit die Inaktivierung des *coxE*-Gens Auswirkungen auf die Expression von CoxF hat und umgekehrt. Beide Saccharosedichtegradienten-Zentrifugationen wurden analog zum zREX-Gradienten CO-induzierter Zellen von *O. carboxidovorans* OM5 durchgeführt. Nach Abpumpen der Gradienten wurde zunächst der Saccharosegehalt (○) und die Proteinkonzentration (●) in jeder Fraktion bestimmt. Die Proteinprofile entsprechen weitestgehend den zREX-Gradienten des Wildtyps (Abb. 3-10 bzw. 3-15). Es zeigen sich zwei größere Dichtebereiche, die jeweils partikuläres bzw. Membran-Protein und lösliches (cytoplasmatisches) Protein repräsentieren. Im zREX-Gradienten der *coxE*-Mutante (Abb. 3-16, A) erstreckt sich ersterer von 69,9 bis 48,7 % (w/v) Saccharose, im Gradienten der *coxF*-Mutante (Abb. 3-16, B) von 71,7 bis 46,6 % (w/v) Saccharose. Als Marker für diesen Bereich wurde die NADH-oxidierende Aktivität der NADH-Dehydrogenase (□) bestimmt, welche bei 60,4 % bzw. 57,4 % (w/v) Saccharose ein Maximum aufweist. Wie auch im zREX-Gradienten des Wildtyps zeigt sich auch im Bereich des cytoplasmatischen Proteins eine NADH-Dehydrogenase Aktivität, die auf ein vergleichbares, lösliches Enzym zurückzuführen ist. Als Marker für den Bereich löslichen Proteins diente die Aktivität der cytoplasmatischen Malat-Dehydrogenase (■) mit Maxima bei 33,7 % bzw. 35,5 % (w/v) Saccharose.

A



B

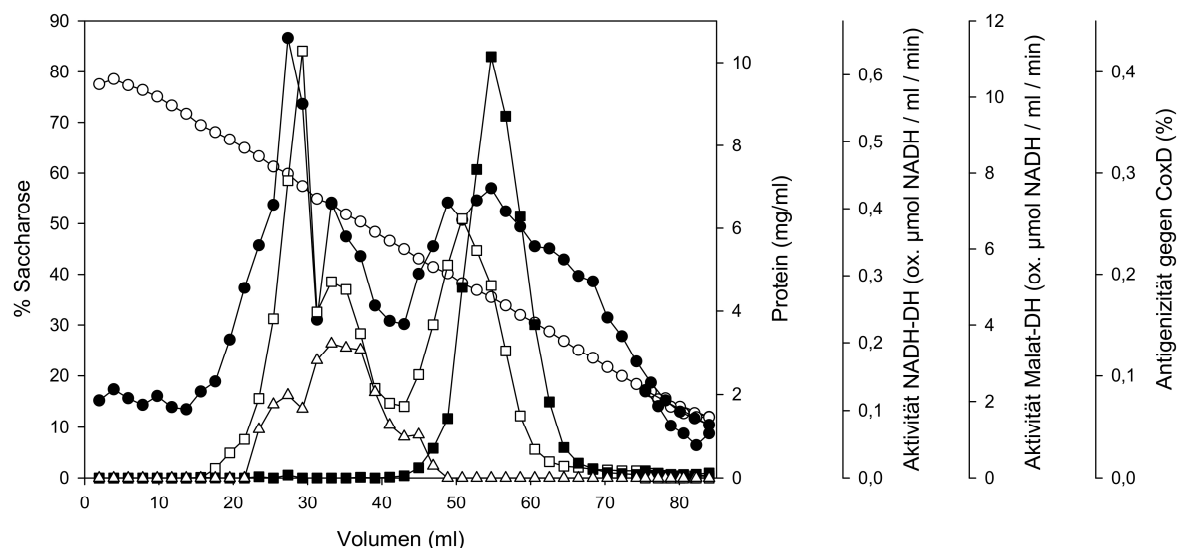


Abbildung 3-16: Translation und Lokalisierung der Proteine CoxD, CoxE und CoxF in zellfreiem Rohextrakt von *O. carboxidovorans* OM5 E::km und F::km mittels Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation.

Zellfreier Rohextrakt (4,5 ml) von *O. carboxidovorans* OM5 E::km (A) und F::km (B), jeweils angezüchtet unter CO-induzierenden Bedingungen, wurde auf einen linearen Saccharosedichtegradienten mit 10 - 80 % (w/v) Saccharose in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 aufgeschichtet. Mittels Ultrazentrifugation wurden die Bestandteile gemäß ihrer Dichte aufgetrennt. Im Anschluss an die Zentrifugation wurden die Gradienten abgepumpt, fraktioniert und zunächst die Saccharosekonzentration (○) refraktometrisch bestimmt (Kap. 2.25.1). Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (●) in jeder Fraktion (Kap. 2.16) wurde jeweils ein Volumen mit 80 µg mit SDS-Kochpuffer versetzt, 5 min im Wasserbad gekocht und über denaturierende PAGE aufgetrennt (Kap. 2.17). Die Proteine wurden danach mittels Western-Blotting (Kap. 2.18) auf eine PVDF-Membran transferiert. In beiden Gradienten konnte mit spezifischen IgG-Antikörpern nur CoxD (Δ) detektiert werden. Für CoxE und CoxF wurden keine Signale erhalten. Als Marker für den partikulären Bereich wurde die

NADH-oxidierende Aktivität von NADH-Dehydrogenase (□) in jeder Fraktion ermittelt, über die Aktivität der Malat-Dehydrogenase (■) konnte der Bereich des löslichen Proteins bestimmt werden (Kap. 2.24.2).

CoxD (Δ) konnte in beiden Gradienten erneut im Bereich des partikulären Proteins detektiert werden und besaß im E::km-Gradienten bei 57,5 und 51,9 % (w/v) Saccharose entsprechende Maxima, im F::km-Gradienten bei 65,0 und 40,2 % (w/v) Saccharose. Zudem konnte das CoxD-Protein im E::km-Gradienten im teilweise schön löslichen Dichtebereich detektiert werden. Dabei könnte es sich allerdings um eine „Verschleppung“ im Zuge des Abpumpens des Gradienten handeln, da CoxD in allen bisherigen Analysen stets membrangebunden detektiert wurde. CoxE und CoxF konnten in beiden zREX-Gradienten nicht detektiert werden. Wie bereits in Kap. 3.7 gezeigt werden konnte, hat das Fehlen von CoxE somit einen direkten Einfluss auf das Vorhandensein des CoxF-Proteins und umgekehrt, obwohl auf Ebene der Transkription nachgewiesen werden konnte, dass in der *coxE*-Mutante eine entsprechende mRNA von *coxF* gebildet wird (Staron 2008). Dass eine Interaktion zwischen CoxE und CoxF möglich ist, zeigen zudem Sequenzanalysen beider Proteine. CoxE besitzt eine Von Willebrand Faktor A - Domäne (Dr. A. Pelzmann, persönliche Mitteilung), während CoxF in seiner Sequenz das dazugehörige Bindemotiv aufweist (Kap. 3.1).

Die Mutationen in den Genen *coxE* und *coxF* haben somit keinen Einfluss auf die Expression von CoxD, welches in beiden Saccharosedichtegradienten der Mutanten E::km und F::km detektiert werden konnte. Umgekehrt zeigt sich aber, dass CoxD für die Translation von CoxE und CoxF entscheidend ist (vgl. Kap. 3-7, Abb. 3-8). Saccharosedichtegradienten mit zellfreiem Rohextrakt der *coxD*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 konnten zudem bestätigen, dass in dieser Mutante weder CoxD noch CoxE und CoxF detektierbar sind (S. Joseph, persönliche Mitteilung).

Die Saccharosedichtegradienten verdeutlichen damit, dass die Proteine CoxD, CoxE und CoxF Oligomere unterschiedlicher Größe ausbilden. Die Art der Anzucht von *O. carboxidovorans* OM5 scheint dabei keinerlei Einfluss auf die Oligomerisierung und subzelluläre Lokalisierung zu haben. CoxD und CoxE erscheinen stets membrangebunden, während CoxF in löslicher Form vorliegt. Die Koinzidenz von CoxD und CoxE könnte zudem auf eine Interaktion beider Proteine schließen lassen.

Die einzelnen Polypeptide zeigen darüber hinaus in den verschiedenen Gradienten ähnliche Profile, sofern sie detektierbar waren. Signale für CoxF können beispielsweise in

Gradienten mit zellfreiem Rohextrakt und in Gradienten mit Cytoplasma in zwei größeren Dichtebereichen erhalten werden, während CoxD und CoxE überwiegend in Bereichen höherer Saccharose-Konzentrationen anzufinden sind. Eine Größenbestimmung über Schachmann (1959) zeigte dabei, dass die detektierten Oligomere von CoxD von 8-meren bis hin zu 22-meren reichen, bei CoxE von 9-meren bis hin zu 15-meren und bei CoxF von 3-meren zu 25-meren, wobei bei derart hohen Oligomerisierungsgraden schon von unspezifischen Proteinaggregaten ausgegangen werden kann.

Die Oligomerisierung von CoxD konnte bereits zuvor von Maisel (2012) beobachtet werden. In Saccharosedichtegradienten wurden oligomere Zustände von CoxD detektiert, die 2-meren, 4-meren und 6-meren entsprachen, wobei die von Maisel (2012) bestätigte ATPase-Aktivität in den 2-meren und 6-meren vorlag. Somit wirkt sich die Art der Oligomerisierung auch auf eine eventuelle Enzym-Aktivität aus. Das überwiegende Vorliegen von 2-meren, 4-meren und 6-meren konnte für CoxD nicht gezeigt werden, was auch dem Vorliegen als Membran-Protein geschuldet ist. So kann in den durchgeführten Triton-Gradienten nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den per Immunoblot erhaltenen Signalen um Komplexe der Cox-Proteine mit Membran-Partikeln gehandelt hat – was bei der Berechnung der entsprechenden molekularen Massen zu erhöhten Werten geführt hat.

3.10 Das Wachstum von *O. carboxidovorans* OM5 (Wildtyp und Mutanten) unter chemolithoautotrophen Bedingungen

Translationsanalysen zeigten, dass in den Mutanten E::km und F::km nur CoxD exprimiert wird (Kap. 3.7, Abb. 3-8, Tab. 3-5). CoxE und CoxF fehlen beide gleichermaßen in beiden Mutanten. Dies lässt den Schluss zu, dass die CO-Dehydrogenasen aus *O. carboxidovorans* OM5 E::km und F::km ununterscheidbar sein sollten. Die Strukturaufklärung der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante erforderte die Produktion großer Mengen an Zellmasse. Um Rückschlüsse auf die Funktion der Polypeptide CoxE und CoxF ziehen zu können, sollte zudem die *coxG*-Mutante näher betrachtet werden. CoxG stellt das unmittelbar auf CoxF folgende Genprodukt des *coxDEFG* Subclusters dar. Somit sollte das Resultat der CoxE/CoxF-Funktion aus dem Vergleich der CO-Dehydrogenasen aus den Mutantenstämmen F::km und G::km ersichtlich werden. CO-Dehydrogenase wird nur in Gegenwart von CO synthetisiert, welches alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle ist. Pelzmann et al. (2009) konnten bestätigen, dass der Mutantenstamm *O. carboxidovorans* OM5 D::km nicht in der

Lage ist, unter CO-chemolithoautotrophen Bedingungen zu wachsen. Aus dieser Tatsache konnte geschlossen werden, dass CO als chemolithoautotrophes Substrat nicht mehr verwertet werden kann, was *CoxD* eine Funktion im CO-Metabolismus zuschreibt (Pelzmann et al. 2009).

Santiago und Meyer (1997) konnten zeigen, dass *O. carboxidovorans* OM5 auch mit Wasserstoff H_2 als Energiequelle und Kohlendioxid CO_2 als Kohlenstoffquelle wachsen kann. Die Mutation in *coxD* hatte hier aber keine Auswirkungen auf das chemolithoautotrophe Wachstum mit H_2 und CO_2 (Pelzmann et al. 2009). Da der *cox*-Gencluster nur in Gegenwart von CO exprimiert und dementsprechend auch nur in dessen Gegenwart eine CO-Dehydrogenase gebildet wird, wurden Wachstumsbedingungen etabliert, bei denen *O. carboxidovorans* OM5 D::km unter einer Atmosphäre mit H_2 und CO_2 angezüchtet wurde. Durch entsprechende Zugabe von CO wurde die Expression des *cox*-Genclusters induziert.

In analoger Weise wurde das Wachstum der Mutantenstämme *O. carboxidovorans* OM5 F::km und G::km untersucht. Wie *coxD* sind auch *coxF* und *coxG* Teil des CO-Stimulons (Meyer 1982; Meyer et al. 1993a; Santiago et al. 1999; Fuhrmann et al. 2003). In Abb. 3-17 sind die Fermentationskurven der Mutantenstämme *O. carboxidovorans* OM5 F::km und G::km dargestellt. Ferner sind für die verschiedenen Wachstumsbedingungen Fermentationskurven eines *O. carboxidovorans* OM5 - Wildtyps dargestellt.

Die *coxF*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 zeigt in Gegenwart von CO kein Wachstum, was bedeutet, dass wie auch bei der *coxD*-Mutante CO als Substrat nicht mehr genutzt werden kann. Somit muss *CoxF* eine Funktion im chemolithoautotrophen CO-Stoffwechsel haben. Das Wachstum mit H_2 und CO_2 ist jedoch nicht beeinträchtigt und zeigt in der exponentiellen Wachstumsphase eine Generationszeit von 10,9 h. Nach Erreichen der stationären Phase betrug die optische Dichte OD_{460} 14,5. CO_2 -Fixierung (vom *cbb*-Cluster kodiert) und Hydrogenase-Aktivität (vom *hox*-Gencluster kodiert) sind durch das Ausschalten der *coxF*-Genfunktion also nicht betroffen. Unter einer $H_2/CO_2/CO/O_2$ -Atmosphäre war ebenfalls Wachstum von *O. carboxidovorans* OM5 F::km möglich. Die Generationszeit in der exponentiellen Wachstumsphase betrug vergleichbare 14,5 h und entsprach der eines unter identischen Bedingungen angezüchteten Wildtyps (Generationszeit 13,7 h).

Das Wachstumsverhalten des Mutantenstammes F::km entspricht damit auch jenem der Mutante E::km (Dr. A. Pelzmann, persönliche Mitteilung), was die Ununterscheidbarkeit beider Stämme erneut unterstreicht.

CoxG wird Sequenzanalysen zufolge als mögliches Bindeprotein hydrophober Liganden beschrieben, was eine Funktion als Membrananker für die CO-Dehydrogenase suggeriert (vgl. Kap. 3-2). Das Polypeptid weist eine PH-Domäne (Pleckstrin Homology Domain) auf (Abb. 3-3), welche Phosphatidylinositol-Membranlipide und Membran-Proteine binden kann. Demzufolge würde CoxG keine direkte Rolle bei der posttranslationalen Reifung des aktiven Zentrums der CO-Dehydrogenase mehr spielen. Die Reifung würde durch die Aktivität/Funktion der *coxE*- und *coxF*-Genprodukte abgeschlossen sein. Somit sollten sich im Wachstum unter verschiedenen Fermentationsbedingungen für die *coxG*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 nur unwesentliche Unterschiede zum Wildtyp ergeben. Abb. 3-17, C zeigt die Wachstumskurven für den Mutantenstamm *O. carboxidovorans* OM5 G::km (vgl. Pelzmann et al. 2014). Anders als bei der *coxF*-Mutante zeigt die *coxG*-Mutante sehr wohl chemolithoautotrophes Wachstum mit CO als alleiniger Energie- und Kohlenstoffquelle, allerdings mit einer Generationszeit von 149 h in der exponentiellen Wachstumsphase. Das Wachstum unter $H_2/CO_2/O_2$ (Generationszeit 13,1 h) entspricht dem unter CO-induzierten Bedingungen mit $H_2/CO_2/CO/O_2$ (Generationszeit 14,7 h) und kann erneut mit dem Wildtyp verglichen werden. Das relativ langsame Wachstum der *coxG*-Mutante aus *O. carboxidovorans* OM5 zeigt somit durchaus eine Funktion von CoxG im chemolithoautotrophen CO-Stoffwechsel, auch wenn das Genprodukt für chemolithoautotrophes Wachstum mit CO nicht zwingend erforderlich zu sein scheint.

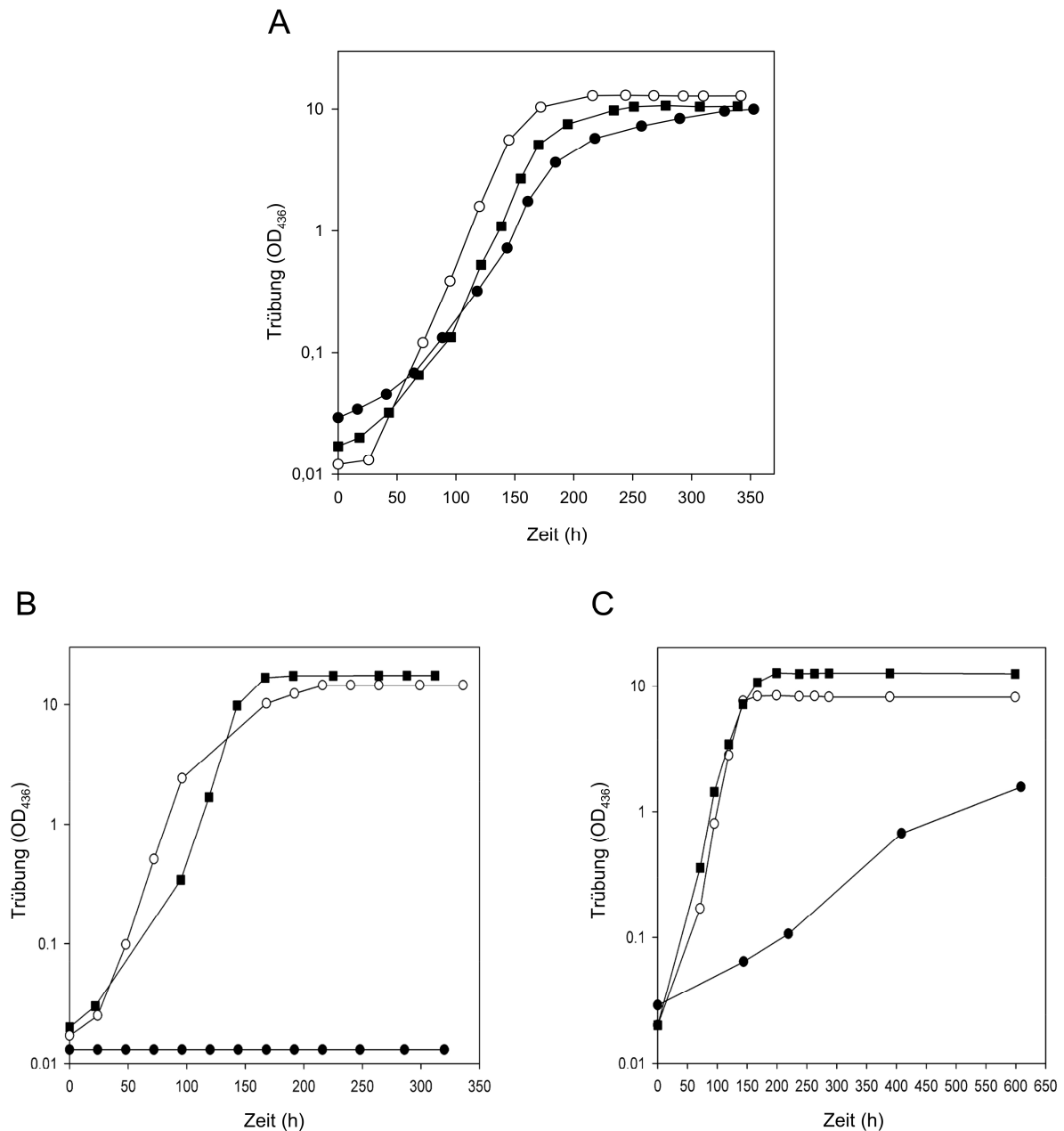


Abbildung 3-17: Wachstumskurven des Wildtyps von *O. carboxivorans* OM5 sowie der Mutanten F::km und G::km.

Der Wildtyp von *O. carboxidovorans* OM5 (A) sowie die Mutanten F::km (B) und G::km (C, aus Pelzmann et al. 2014) wurden unter aeroben, chemolithoautotrophen Bedingungen kultiviert. Die Anzucht erfolgte in einem 70 L - Fermentor in Mineralmedium unter verschiedenen Gasatmosphären (alle Werte in % v/v): 45 CO₂, 5 CO₂, 50 O₂ (●); 40 H₂, 10 CO₂, 50 O₂ (○); und 30 H₂, 5 CO₂, 30 CO, 35 O₂ (■).

3.11 Anreicherung und Isolierung der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* OM5 F::km

Zur Klärung der Funktion des *coxF*-Genproduktes sollte die CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 analysiert und charakterisiert werden. Ein Vergleich dieses Präparats mit dem Enzym aus der *coxG*-Mutante als auch mit der CO-Dehydrogenase des Wildtyps sollte Aufschluss darüber geben, welche Rolle CoxF bei der posttranslationalen Assemblierung des [CuSMoO₂]-Clusters im aktiven Zentrum von CO-Dehydrogenase spielt – und bei welchem Assemblierungsschritt die Reifung unterbrochen wird, wenn das *coxF*-Gen inaktiviert vorliegt.

Von der *coxD*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 ist bekannt, dass das aktive Zentrum als [MoO₃]-Ion vorliegt (Pelzmann et al. 2009), woraus geschlossen wurde, dass CoxD, welches direkt oder indirekt am ersten Schritt der Assemblierung beteiligt ist, eine zentrale Rolle beim Schwefel-Transfer haben muss. So könnte CoxD selbst als Sulfurase den cyanolysierbaren Schwefel in das aktive Zentrum übertragen, oder als Chaperon die Apo-CO-Dehydrogenase entfalten, so dass der Schwefel von einer anderen Sulfurase inseriert werden kann (Maisel 2012).

Die Bedeutung von CoxF bei der posttranslationalen Reifung sollte in ähnlicher Weise anhand der CO-Dehydrogenasen der *coxF*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 untersucht werden. Hierfür war zunächst die Aufreinigung und Isolierung großer Enzym-Mengen erforderlich. Die Anreicherung erfolgte über die Schritte Zellaufschluss, Ultrazentrifugation zur Herstellung einer cytoplasmatischen Fraktion, Anionenaustauschchromatographie und hydrophober Interaktionschromatographie (Gremer und Meyer 1996b). Auf diese Weise konnte das entsprechende Enzym zu einem hohen Reinheitsgrad angereichert und isoliert werden. Um die für die Analysen benötigten Protein-Mengen bereitstellen zu können, wurde das Anreicherungsverfahren für F::km sechsfach durchgeführt. In allen Durchführungen konnten ähnliche Anreicherungsfaktoren (zwischen 13,9-fach und 16,2-fach) und Ausbeuten (19,3 bis 37,2 %) erzielt werden.

Die Isolierung des Enzyms soll nachfolgend exemplarisch an einer Durchführung dargestellt werden. Zellmaterial von *O. carboxidovorans* OM5 F::km wurde zunächst wie unter Kap. 2.7.1 beschrieben unter einer H₂/CO₂/CO/O₂-Atmosphäre angezüchtet. Die Zugabe von CO diente dabei der Induzierung der Synthese von CO-Dehydrogenase (Dobbek et al. 1999; Santiago et al. 1999; Pelzmann et al. 2009). Zunächst wurden 217,4 g Zellen aufgeschlossen. Durch Ultrazentrifugation konnte eine cytoplasmatische Fraktion erhalten

werden (Kap. 2.11), welche einer Anionenaustauschchromatographie unterzogen wurde (Kap. 2.15.1).

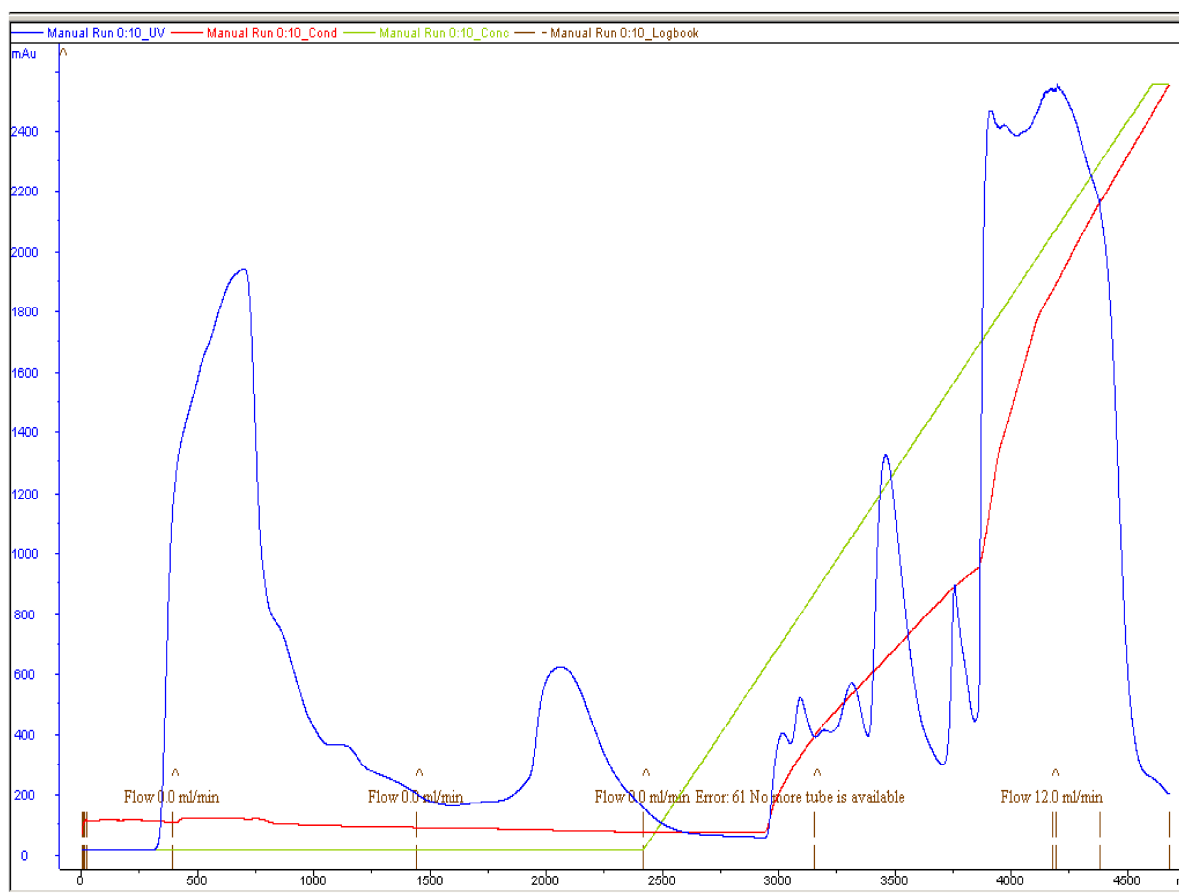


Abbildung 3-18: Anreicherung der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* OM5 F::km mittels Anionenaustauschchromatographie.

Nach Zellaufschluss von *O. carboxidovorans* OM5 F::km und Ultrazentrifugation des erhaltenen Rohextraktes wurde die cytoplasmatische Fraktion (Volumen 439 ml, 3476,9 mg Protein) auf eine Macro-Prep High Q Anionenaustauscher-Säule aufgetragen und chromatographisch getrennt. Die Säule hatte ein Bettvolumen von 500 ml und wurde zuvor mit 50 mM $K_2PO_4/NaOH$ pH 7,2 äquilibriert. Proteine, die nicht an das Säulenmaterial gebunden hatten, wurden mit 2,0 L 50 mM $K_2PO_4/NaOH$ pH 7,2 eluiert. Gebundenes Protein wurde mit 2,2 L eines linearen KCl-Gradienten von 0 bis 1 M KCl in 50 mM $K_2PO_4/NaOH$ pH 7,2 eluiert. Die Flussrate betrug 8 ml/min, das Fraktionsvolumen 18 ml. Die chromatographische Auftrennung der cytoplasmatischen Fraktion wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm (—) verfolgt. Ferner wurde die theoretische (—) und tatsächlich gemessene Leitfähigkeit (—) ermittelt.

Die Identifizierung der CO-Dehydrogenase in den Fraktionen erfolgte anhand der typisch gelb-braunen Farbe des Enzyms als auch durch Verfolgen des Proteingehalts durch Messen der Absorption bei 280 nm (A_{280}). Ein Nachweis über die Messung der CO-oxidierenden

Aktivität stellte sich als nicht sinnvoll heraus, da diese im Rohextrakt unmittelbar nach Zellaufschluss bei lediglich 0,008 U/mg lag (Tab. 3-8). Die Fähigkeit des Mutanten-Enzyms, an das Säulenmaterial zu binden, entsprach der des Wildtyp-Enzyms, so dass in einem linearen KCl-Gradienten (0 bis 1 M) das Protein eluiert werden konnte. Die Elution erfolgte bei ca. 0,3 M KCl und die CO-Dehydrogenase enthaltenden Fraktionen wurden anschließend vereinigt. Durch die Anionenaustauschchromatographie konnten bereits 81,0 % des im Cytoplasma vorhandenen Fremdproteins von den CO-Dehydrogenase Fraktionen abgetrennt werden (vgl. Tab. 3-8).

Die vereinigten CO-Dehydrogenase-Fraktionen wurden in einem nächsten Anreicherungsschritt einer hydrophoben Interaktionschromatographie an Butylsepharose 4 unterzogen (Kap. 2.15.2). Hierbei wurde die Tatsache genutzt, dass CO-Dehydrogenase in Gegenwart von Ammoniumsulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sehr gut an dieses Säulenmaterial bindet. Ammoniumsulfat ist in der Lage, hydrophobe Wechselwirkungen durch einen starken „Aussalzeffekt“ zu verstärken. Es konkurriert mit der Hydrathülle der CO-Dehydrogenase und legt hydrophobe Bereiche des Enzyms auf der Oberfläche offen.

Die CO-Dehydrogenase-Fraktionen wurden nach Vereinigung zunächst mit Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 1,21 M versetzt. Während dieses „Aufsalzens“ präzipitieren Fremdproteine, welche durch niedertourige Zentrifugation abgetrennt werden konnten. Der erhaltene Überstand wurde auf das Säulenmaterial aufgetragen und chromatographiert (Abb. 3-19). Die Elution der CO-Dehydrogenase, welche an die Butylsepharose 4 gebunden hatte, erfolgte durch Anlegen eines linearen Gradienten von 0,85 M Ammoniumsulfat / 0 % (v/v) Isopropanol bis 0 M Ammoniumsulfat / 30 % (v/v) Isopropanol. Bei ca. 0,35 M Ammoniumsulfat / ca. 15 % (v/v) Isopropanol eluierte das Zielprotein (Abb. 3-19). Durch Verfolgen des Proteinprofils mittels Messung der Absorption bei 280 nm in Kombination mit der typischen gelb-braunen Farbe der CO-Dehydrogenase, konnte das Zielprotein identifiziert werden. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und im Anschluss über Gelchromatographie entsalzt (Kap. 2.15.3). Durch diesen Aufreinigungsschritt konnten 48,4 % des nach Anionenaustauschchromatographie erhaltenen Proteins abgetrennt werden (vgl. Tab. 3-8).

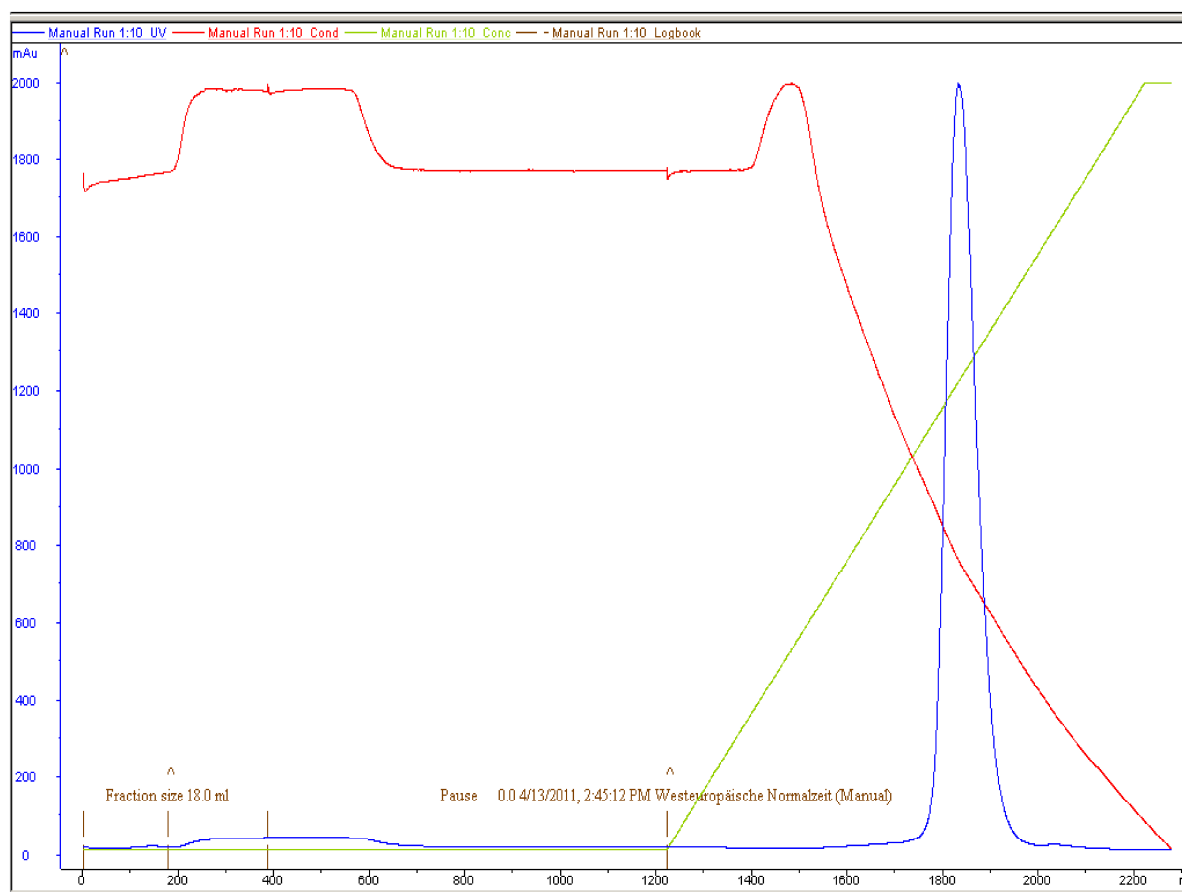


Abbildung 3-19: Anreicherung der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* OM5 F::km mittels hydrophober Interaktionschromatographie.

Die nach Anionenaustauschchromatographie vereinigten Fraktionen mit CO-Dehydrogenase (Volumen 229 ml, 659,5 mg Protein) wurden zunächst mit Ammoniumsulfat auf eine Konzentration von 1,21 M gebracht. Mittels niedertouriger Zentrifugation wurde präzipitiertes Protein abgetrennt und der Überstand auf eine Butylsepharose 4B-Säule aufgetragen. Das Bettvolumen betrug 200 ml, die Säule wurde zuvor mit 0,85 M Ammoniumsulfat in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ pH 7,2 + 1 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ äquilibriert. Mit 700 ml Äquilibrationpuffer konnten nicht gebundene Proteine eluiert werden. Zur Elution von gebundenem Protein wurden 1,6 L eines linearen Gradienten von 0,85 M Ammoniumsulfat / 0 % (v/v) Isopropanol bis 0 M Ammoniumsulfat / 30 % (v/v) Isopropanol in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ pH 7,2 verwendet (Kap. 2.15.2). Die Flussrate betrug 8 ml/min, das Fraktionsvolumen 18 ml. Der Verlauf der Chromatographie wurde anhand der Absorption bei 280 nm (—) verfolgt. Des Weiteren wurde die theoretische Konzentration an Isopropanol (—) und die Konzentration an Ammoniumsulfat über die Leitfähigkeit (—) ermittelt.

Während des gesamten Verlaufs der Aufreinigung wurden Aliquots entnommen und diese mittels nicht-denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 3-20, A). Zur Ermittlung des Anteils an CO-Dehydrogenase in den jeweiligen Fraktionen wurde das Polyacrylamid-Gel videodensitometrisch ausgewertet (Kap. 2.23). Ferner wurde in den

Proben der verschiedenen Aufreinigungsschritte die CO-oxidierende Aktivität ermittelt (Kap. 2.24.1). Diese liegt im Rohextrakt bei 0,008 U/mg. Das aufgereinigte Enzym besitzt eine Aktivität von 0,136 U/mg, und damit nur 0,6 % der Aktivität einer katalytisch kompetenten CO-Dehydrogenase aus dem Wildtyp von *O. carboxidovorans* OM5 mit 23 U/mg (Meyer et al. 2000).

Über die verschiedenen Aufreinigungsschritte (Ultrazentrifugation, Anionenaustauschchromatographie, hydrophobe Interaktionschromatographie) konnte die CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 mit einer Ausbeute von 37,2 % und einem Faktor von 16,2 angereichert werden. Der Anteil an CO-Dehydrogenase im Rohextrakt betrug 5,9 %.

Tabelle 3-8: Anreicherung der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* OM5 F::km.

Für die verschiedenen Schritte der Anreicherung und Isolierung des Mutanten-Enzyms wurde die Gesamtmenge an Protein sowie über native PAGE und videodensitometrische Auswertung der Gehalt an CO-Dehydrogenase ermittelt. Des Weiteren wurde jeweils die CO-oxidierende Aktivität ermittelt. Ausgehend von diesen Daten wurde die Ausbeute und der Anreicherungsfaktor berechnet.

Anreicherungs-schritt	Protein (mg)	CODH (mg)	CODH (%)	Ausbeute (%)	Anreicherung (x-fach)	spezifische CO-ox. Aktivität (U/mg)
Rohextrakt nach Zellaufschluss	11305,0	664,9	5,9	100	1,0	0,008
zellfreier Rohextrakt nach niedertouriger Zentrifugation	6100,0	529,3	8,7	79,6	1,5	0,012
Ultrazentrifugation	3476,9	435,3	12,5	65,5	2,1	0,018
Anionenaustauschchromatographie	659,5	365,3	55,4	54,9	9,4	0,078
hydrophobe Interaktionschromatographie	340,0	321,7	94,6	48,4	16,1	0,135
Entsalzen durch Gelchromatographie	259,94	247,4	95,2	37,2	16,2	0,136

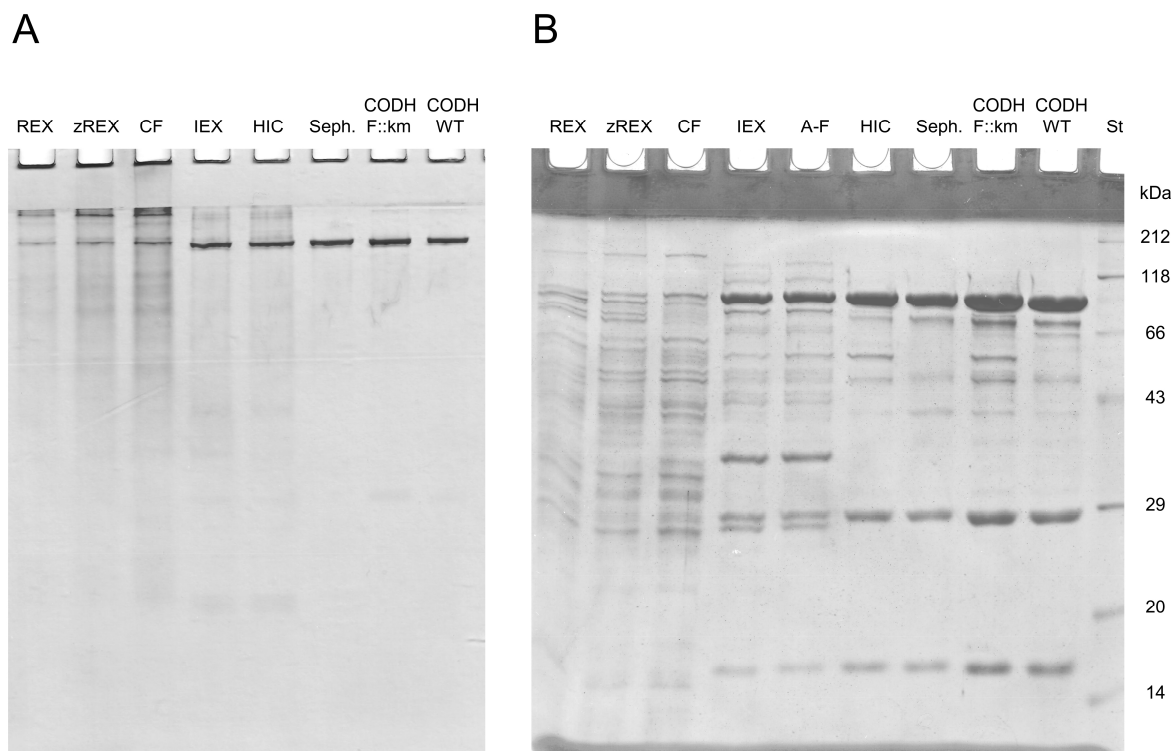


Abbildung 3-20: Verlauf der Aufreinigung / Anreicherung der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* OM5 F::km.

Die Anreicherung der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* OM5 F::km wurde nach Zellaufschluss über den gesamten Verlauf der Aufreinigung mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese verfolgt. 30 µg Protein wurden jeweils pro Bahn aufgetragen. Folgende Proben wurden aufgetragen: Rohextrakt (REX), zellfreier Rohextrakt (zREX) nach niedertouriger Zentrifugation, Cytoplasma (CF), gepoolte Fraktion nach Anionenaustauschchromatographie (IEX), nach Aufsalzen mit 4,05 M Ammoniumsulfat-Lösung (A-F), nach hydrophober Interaktionschromatographie (HIC), nach Entsalzen bzw. Umpuffern in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 (Seph.) und aufgereinigte CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante nach Aufkonzentrieren (CODH F::km). Als Referenz diente aufgereinigte CO-Dehydrogenase aus dem Wildtyp von *O. carboxidovorans* OM5.

(A) natives Polyacrylamid-Gel mit 5 %-igem Sammelgel und 7,5 %-igem Trenngel

(B) denaturierendes Polyacrylamid-Gel mit 7,5 %-igem Sammelgel und 12 %-igem Trenngel

Die CO-Dehydrogenase aus der *coxG*-Mutante wurde im Rahmen einer Bachelor-Arbeit am Lehrstuhl Mikrobiologie, Universität Bayreuth, mit einer Ausbeute von 18 %, 28-fach angereichert (Hager 2011). Somit war ein direkter Vergleich mit dem Präparat der *coxF*-Mutante möglich.

3.12 Die Mutation im *coxF*-Gen von *O. carboxidovorans* OM5 hat keinen Einfluss auf die Assemblierung und Mobilität der gebildeten CO-Dehydrogenase

Die CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 besitzt gegenüber dem Wildtyp-Enzym eine vergleichsweise äußerst geringe Aktivität, so dass sie als nahezu inaktiv bezeichnet werden kann. Mittels nativer und denaturierender PAGE wurde analysiert, ob der Verlust an Aktivität auf eine fehlerhafte Assemblierung des Enzyms zurückgeführt werden kann.

Mit Hilfe nativer PAGE konnte die Mobilität des Mutanten-Enzyms mit dem des Wildtyp-Präparates verglichen werden. Hierbei zeigte sich für beide CO-Dehydrogenasen ein identisches Wanderungsverhalten (Abb. 3-20, A, Bahn „CODH F::km“ und „CODH WT“). Dies zeigt, dass die CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante vollständig assembliert vorliegt.

Mittels denaturierender PAGE konnten für das Mutantenenzym alle drei Cox-Polypeptide der CO-Dehydrogenase (CoxL, CoxM und CoxS) nachgewiesen werden, die Mobilitäten entsprachen denen des Wildtyp-Enzyms (vgl. hierzu Abb. 3-20, B, Bahn „CODH F::km“ und „CODH WT“). Die videodensitometrische Auswertung des Polyacrylamid-Gels ergab, dass für das Enzym aus der *coxF*-Mutante die drei Untereinheiten CoxL, CoxM und CoxS eine Stöchiometrie von 1:1:1 aufweisen, so dass wie beim Wildtyp von einer (LMS)₂-Untereinheitenstruktur auszugehen ist und das Enzym demnach vollständig assembliert vorliegt. Die Translation der *cox*-spezifischen mRNA, die Faltung der Polypeptide und die Assemblierung zur korrekten Untereinheitenstruktur werden durch die Mutation im Gen *coxF* somit nicht beeinflusst.

3.13 Im Gegensatz zu *O. carboxidovorans* OM5 G::km wird in der *coxF*-Mutante eine inaktive CO-Dehydrogenase gebildet, die cyanolysierbaren Schwefel besitzt, aber Kupfer-defizient ist

In der *coxD*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 konnte nahezu kein cyanolysierbarer Schwefel und kein Kupfer gefunden werden (Pelzmann et al. 2009). Das Enzym besitzt keinerlei CO-oxidierende Aktivität. Wie Röntgenstrukturanalysen zeigten, stellt sich das aktive Zentrum als [MoO₃] site dar, welches chemisch jedoch zu einem aktiven und funktionellen Enzym rekonstituiert werden kann (Pelzmann et al. 2009). Die CO-

Dehydrogenase aus der *coxE*-Mutante besitzt cyanolysierbaren Schwefel: 2,0 mol pro mol Enzym konnten hier gefunden werden, allerdings ist das Enzym ebenfalls Kupfer-defizient und inaktiv (Dr. A. Pelzmann, persönliche Mitteilung). Dass das Enzym Schwefel im aktiven Zentrum besitzt, lässt den Schluss zu, dass CoxD eine zentrale Rolle bei der Schwefel-Inkorporation spielt (Maisel et al. 2012; Pelzmann et al. 2009). Die Funktion von CoxD wird somit in der *coxE*-Mutante ersichtlich, als auch in der *coxF*-Mutante. Translationsanalysen zeigten, dass in beiden Mutanten CoxE und CoxF gleichmaßen nicht vorhanden sind (Kap. 3.7, Abb. 3-8, Tab. 3-5). Die *coxE*- und die *coxF*-Mutante sollten daher ununterscheidbar sein. In analoger Weise kann eine Betrachtung der CO-Dehydrogenase aus der *coxG*-Mutante Rückschlüsse auf die Funktion des *coxF*-Genproduktes ermöglichen.

Die aufgereinigte CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* OM5 F::km wurde zunächst auf eine eventuell vorhandene CO-oxidierende Aktivität untersucht. Dabei ergab sich eine Aktivität von 0,136 U/mg. Dass es sich dabei um eine Enzymaktivität handelt und nicht um eine Enzym-unabhängige Formazan-Bildung konnte durch Einsetzen unterschiedlicher Enzymkonzentrationen im Testmix des Aktivitätsansatzes bestätigt werden. Mit zunehmender Enzymkonzentration stieg die Absorptionsänderung pro min linear an (Abb. 3-21). Im Gegensatz dazu zeigte das aufgereinigte CO-Dehydrogenase Präparat der *coxG*-Mutante eine Aktivität von 4,36 U/mg (Hager 2011), was auf ein vollständig assembliertes, aktives Zentrum hindeutet.

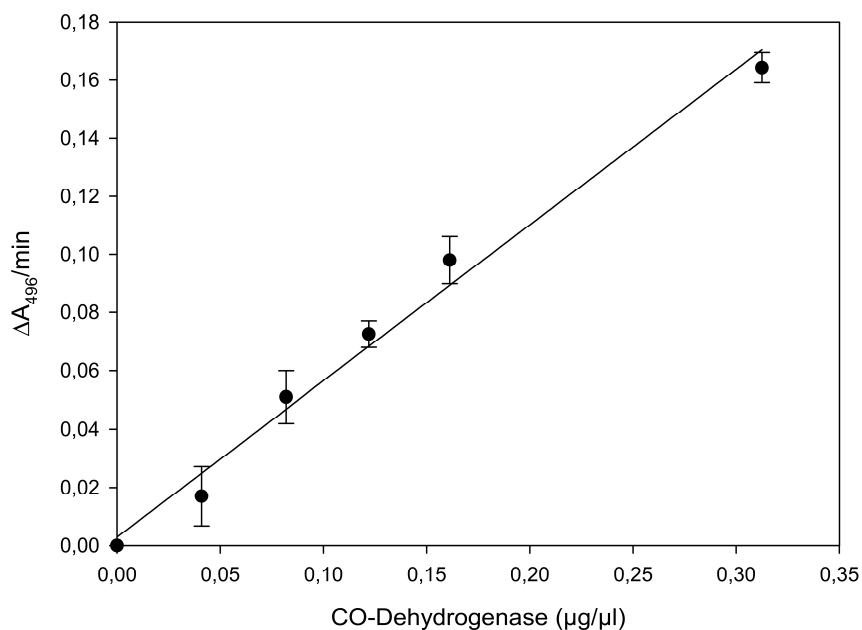


Abbildung 3-21: CO-oxidierende Aktivität der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5.

Um das Vorliegen von Enzymproportionalität zu überprüfen wurden dem Aktivitäts-Testmix unterschiedliche Enzym-Mengen zugegeben und die jeweilige Änderung der Absorption bei 496 nm im Zuge der Formazanbildung bestimmt (Kap. 2.24.1). Mit zunehmender Konzentration der CO-Dehydrogenase im Testmix, kommt es zu einem linearen Anstieg der Extinktionsänderung pro Zeiteinheit.

Um das Fehlen der CO-oxidierenden Aktivität zu untersuchen, wurde die CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante unterschiedlichen Element-Analysen unterzogen. Die Bestimmung von Molybdän erfolgte sowohl über Atom-Absorptions-Spektroskopie (Kap. 2.27.2), als auch über Neutronenaktivierungsanalyse und ICP-MS (Kap. 2.27.3 bzw. 2.27.4). Außerdem wurde Molybdän auch chemisch durch oxidative, feuchte Veraschung in 96 % (v/v) Schwefelsäure / 30 % (v/v) H₂O₂ und anschließender colorimetrischer Bestimmung des gebildeten Dithiolkomplexes bestimmt (Kap. 2.27.1). Eine katalytisch aktive, im aktiven Zentrum voll besetzte CO-Dehydrogenase besitzt einen Anteil von 2,0 mol Mo pro mol Enzym (Gremer 2000; Dobbek et al. 2002). Für die CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante konnte ein mittlerer Molybdän-Gehalt von $1,83 \pm 0,046$ mol pro mol Enzym ermittelt werden (Mittelwert aus der chemischen Analyse, Atom-Absorptions-Spektroskopie, ICP-MS und Neutronenaktivierungsanalyse), was einem Anteil von 91,4 % gegenüber einem voll-besetzten Enzym entspricht. Für das Präparat aus der *coxG*-Mutante konnten $1,89 \pm 0,028$ mol Molybdän pro mol Protein gemessen werden (Mittelwert aus chemischer Analyse

(Hager 2011) und Atom-Absorptions-Spektroskopie). Dies entspricht einem Besetzungsgrad von 94,5 %.

Zum Vergleich wurden auch zwei Wildtyp-Präparate analysiert, ein Enzym eines CO-chemolithoautotroph gewachsenen und ein Enzym eines CO-induziert angezüchteten Wildtyps. Für das erstere Präparat wurden $1,77 \pm 0,113$ mol, für letzteres $1,76 \pm 0,232$ mol Mo pro mol Protein detektiert. Beide Wildtyp-Präparate besaßen damit nicht den zu erwartenden Molybdän-Gehalt von 2,0 mol pro mol Enzym, der Gehalt war mit 88,5 % bzw. 88,2 % dennoch relativ hoch. Die Molybdän-Gehalte der Wildtyp-Präparate und der Mutanten in *coxF* und *coxG* entsprechen somit weitestgehend einander und es zeigt sich, dass die Mutation in *coxF* keinen Einfluss auf das Molybdän-Zentrum hat.

Zur weiteren Charakterisierung des aktiven Zentrums des Präparats der *coxF*-Mutante wurde untersucht, ob cyanolysierbarer Schwefel vorhanden ist (Kap. 2.27.1). Das Enzym-Präparat wurde hierfür zunächst 20 h mit 5 mM KCN inkubiert. Eventuell vorhandener cyanolysierbarer Schwefel wird dabei als SCN^- freigesetzt (Dobbek et al. 2002; Resch et al. 2005), welches durch Zugabe von SÖRBOS-Reagenz ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$) als rotbraunes Eisenrhodanid ($\text{Fe}(\text{SCN})_3$) nachgewiesen werden kann. Aufgereinigte CO-Dehydrogenase aus dem Wildtyp von *O. carboxidovorans* OM5 diente als Referenz, hier konnte von 2,0 mol cyanolysierbarem Schwefel pro mol Enzym ausgegangen werden (Dobbek et al. 2002; Resch et al. 2005). Die erhaltenen Spektren sind in Abb. 3-22 dargestellt.

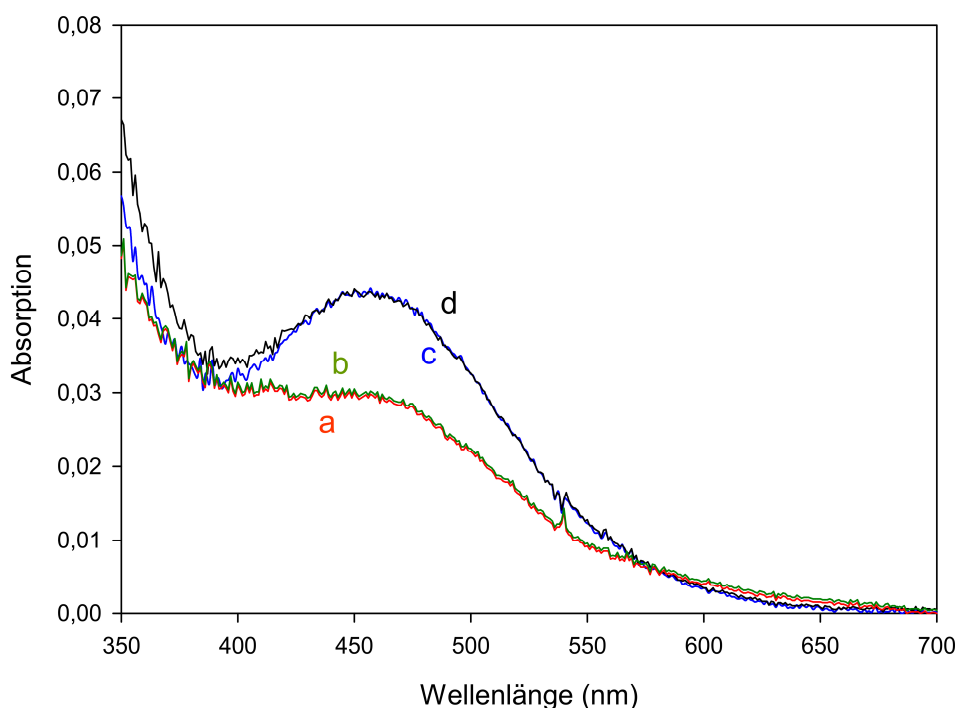


Abbildung 3-22: Gehalt an cyanolysierbarem Schwefel in den CO-Dehydrogenasen aus dem Wildtyp von *O. carboxidovorans* OM5 sowie der *coxF*-Mutante.

CO-Dehydrogenase (3 mg/ml) aus dem Wildtyp von *O. carboxidovorans* OM5 (Spektren *c* und *d*) sowie dem Mutantenstamm F::km (Spektren *a* und *b*) wurden unter anaeroben Bedingungen mit 5 mM KCN versetzt und 20 h inkubiert. Der Proteinanteil wurde durch Zentrifugation an einer Membran mit 30 kDa Ausschlussgrenze abgetrennt und das proteinfreie Eluat mit SÖRBOS-Reagenz versetzt. Entstandenes $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ konnte durch Messung der Extinktion bei 460 nm spektralphotometrisch bestimmt werden. Die Quantifizierung des cyanolysierbaren Schwefels erfolgte auf Grundlage der molekularen Masse von CO-Dehydrogenase mit 277 kDa.

Für das Wildtyp-Präparat (Aktivität 15,11 U/mg) konnte ein Gehalt an cyanolysierbarem Schwefel von $1,93 \pm 0,05$ mol pro mol Protein gemessen werden. Dies ergibt bezogen auf den Molybdän-Gehalt von $1,77 \pm 0,113$ mol pro mol Enzym (ermittelt über Atom-Absorptions-Spektroskopie) einen Schwefel-Gehalt von 1,09 mol pro mol Molybdän, was dem zu erwartenden, theoretischen Wert von 1 mol bei einem voll-bestückten Präparat entspricht (Dobbek et al. 2002; Resch et al. 2005). Das hier analysierte Protein stammte von einem CO-chemolithoautotroph angezüchteten Wildtyp von *O. carboxidovorans* OM5. Da die Kultivierung des Mutantenstammes *O. carboxidovorans* OM5 F::km unter CO-induzierenden Bedingungen erfolgte, wurde als zusätzliche Referenz die CO-Dehydrogenase eines Wildtyps verwendet, der unter den gleichen Wachstumsbedingungen angezogen wurde. Für dieses Präparat konnte ein Gehalt von $1,53 \pm 0,014$ mol cyanolysierbaren Schwefels pro mol Enzym gemessen werden. Bei einem Molybdän-Gehalt von $1,76 \pm 0,232$ mol ergibt sich damit ein Schwefelgehalt von 0,869 mol pro mol Molybdän. In der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante konnten $1,40 \pm 0,129$ mol pro mol Protein cyanolysierbaren Schwefels nachgewiesen werden, und damit 0,765 mol pro mol Molybdän bei einem mittleren Molybdän-Gehalt von $1,83 \pm 0,046$ mol pro mol Enzym (ermittelt über chemische Analysen, Atom-Absorptionsspektroskopie, ICP-MS und Neutronenaktivierungsanalyse). Für die CO-Dehydrogenase aus der *coxG*-Mutante konnten $2,17 \pm 0,080$ mol cyanolysierbaren Schwefels pro mol Enzym bestimmt werden (Hager 2011) und damit 1,15 mol pro mol Molybdän. Das Enzym der *coxF*-Mutante weist damit eine leichte Defizienz an cyanolysierbaren Schwefel auf, welche aber nicht auf die Wachstumsbedingungen (CO-chemolithoautotroph gegenüber CO-induziert) zurückgeführt werden kann, wie der Vergleich mit der *coxG*-Mutante zeigt.

Zusätzlich zur Bestimmung der Gehalte an cyanolysierbarem Schwefel wurde untersucht, ob anstelle des Schwefels Selen im aktiven Zentrum der *coxF*-Mutante gebunden ist. Schock (2013) konnte zeigen, dass ein am Molybdän gebundenes Selen oder ein Selen in Form eines Selenopersulfids gleichermaßen cyanolysierbar ist und bei der Bestimmung des cyanolysierbaren Schwefels mit-detektiert würde. Zudem ging die ursprünglich von Meyer et al. (2000) postulierte Struktur des aktiven Zentrums der CO-Dehydrogenase davon aus, dass ein Selen zwischen dem μ -Brückenschwefel und dem Cystein³⁸⁸ eingebaut ist – dort, wo nach aktuellem Stand (Dobbek et al. 2002; Gnida et al. 2003; Pelzmann et al. 2009) ein Kupfer-Ion vorkommt. Das Selen eines solchen Selenotrisulfids wäre außerdem wie das Cu(I) cyanolysierbar und würde bei der Bestimmung des cyanolysierbaren Schwefels nach Westley (1981) (Kap. 2.27.1) ebenfalls mit-detektiert werden.

Die direkte Ermittlung des Selengehalts erfolgte nach der Methode von Dye et al. (1987) (Kap. 2.27.1), bei der Se(IV) mit 3,3'-Diaminobenzidin reagiert. Das Produkt, Piazselenol, kann anschließend fluorometrisch detektiert werden. Die Reduktion sämtlichen in der CO-Dehydrogenase enthaltenen Selens erfolgte durch Kochen des feucht-veraschten Enzyms in HCl. Für die CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante konnten $0,309 \pm 0,116$ mol Se pro mol Protein detektiert werden. Ein Präparat eines CO-chemolithoautotroph angezüchteten Wildtyps diente als Referenz und enthielt $0,298 \pm 0,097$ mol Se pro mol Enzym. Beide Werte entsprechen einander und es kann – wie auch von Gnida et al. (2003) beschrieben – davon ausgegangen werden, dass es sich dabei um Selen handelt, welches anstelle des Schwefels in Methioninen eingebaut wurde.

Für die Bestimmung von Cu wurden sowohl chemische Bestimmungen als auch Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) herangezogen. Bei der chemischen Bestimmung von Cu(I) nach Brenner und Harris (1995) wird das in Form von Kupfercyanat freigesetzte Cu(I) mit Bicinchoninsäure zur Reaktion gebracht. Der resultierende Cu(I)-BCA-Komplex kann anschließend photometrisch anhand seines Absorptionsmaximums bei 562 nm nachgewiesen werden. Als Referenz dienten CO-Dehydrogenasen eines CO-chemolithoautotroph angezogenen und eines CO-induziert gewachsenen Wildtyps von *O. carboxidovorans* OM5. $1,79 \pm 0,01$ mol Cu pro mol Enzym konnten für den CO-chemolithoautotroph gewachsenen Wildtyp detektiert werden, und $1,42 \pm 0,011$ mol Cu pro mol Enzym für den Wildtyp, der CO-induziert angezogen wurde. Die Analyse der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante ergab $0,046 \pm 0,001$ mol Cu(I) pro mol Protein. Damit wird im Mutantenstamm F::km eine Kupfer-defiziente CO-Dehydrogenase gebildet, die einen Kupferanteil von nur 2,3 % im Vergleich zu einem vollbesetzten Wildtyp-Präparates enthält (Dobbek et al. 2002; Gnida et al.

2003; Resch et al. 2005). Für das Präparat aus der *coxG*-Mutante waren $2,05 \pm 0,130$ mol Cu(I) pro mol Protein ermittelt worden (Hager 2011).

Die erhaltenen Kupfer-Gehalte konnten zudem durch Atomabsorptionsspektroskopie bestätigt werden. Hier konnten für das Enzym aus der *coxF*-Mutante $0,043 \pm 0,004$ mol Cu(I) pro mol Enzym detektiert werden. Für die CO-Dehydrogenase aus der *coxG*-Mutante wurden $1,48 \pm 0,078$ ermittelt, während für den CO-chemolithoautotroph gewachsenen Wildtyp $1,62 \pm 0,053$ mol pro mol Protein gemessen wurden. Für das Präparat des CO-induziert gewachsenen Wildtyps ergab sich ein Cu(I)-Anteil von $1,47 \pm 0,026$ mol pro mol Enzym. Die erhaltenen Werte für die Wildtyp-Präparate lagen damit zwar nicht beim theoretisch erwarteten Wert von 2 mol pro mol Protein bzw. 1 mol pro mol Molybdän (Dobbek et al. 2002; Resch et al. 2005), wiesen aber mit 81 % bzw. 73,5 % recht hohe Besetzungsgrade auf. Das nahezu gänzliche Fehlen von Kupfer in der *coxF*-Mutante ist erneut nicht auf die CO-induzierenden Wachstumsbedingungen zurückzuführen, sondern kann als eine Folge der Abwesenheit der *coxE*- und *coxF*-Genprodukte angesehen werden. Den Proteinen CoxE und CoxF kann daher eine zentrale Rolle beim Einbau des Kupfers in das aktive Zentrum zugeschrieben werden. Im Mutantenstamm G::km liegt dagegen eine vollständig assemblierte CO-Dehydrogenase vor, was mit der gemessenen CO-oxidierenden Aktivität in Einklang steht.

Wie der Kupfer-Gehalt wurde auch das Vorkommen von Zink mittels Atomabsorptionsspektroskopie ermittelt. Zusätzlich wurde eine Bestimmung mittels Neutronenaktivierungsanalyse herangezogen. Die Detektion von Zink diente v.a. der Fragestellung, ob dieses in der CO-Dehydrogenase der *coxF*-Mutante im aktiven Zentrum gebunden haben und ggf. die Position des Kupfers eingenommen haben könnte. Obwohl cyanolysierbarer Schwefel im Mutanten-Enzym vorhanden ist, war eine Cu-Rekonstitution lediglich bis auf 1,12 U/mg möglich (vgl. hierzu Kap. 3.15). Resch (2004) konnte zeigen, dass ein Enzym-Präparat mit einem Schwefelgehalt von $1,22 \pm 0,165$ mol pro mol Enzym mit Cu(I) zu wesentlich höheren Aktivitäten rekonstituiert werden kann (9,45 U/mg). Die geringe Aktivierbarkeit des Enzyms aus der *coxF*-Mutante könnte einerseits auf einen „inkompetenten“ cyanolysierbaren Schwefel zurückzuführen sein, der z.B. aufgrund seiner Position am Molybdän oder am Cystein³⁸⁸ als Persulfid eine Verbrückung im aktiven Zentrum mit Cu(I) verhindert, oder aber durch ein anderes störendes Metall wie Zink, welches den Kupfer-Einbau blockieren könnte. Meyer (1982) war darüber hinaus in der Lage, relativ hohe, stöchiometrische Mengen an Zink in Wildtyp-Präparaten von CO-Dehydrogenasen zu detektieren ($2,72$ mol pro mol CO-Dehydrogenase). In Abb. 3-23 sind verschiedene,

hypothetische Strukturen des aktiven Zentrums der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante dargestellt, unter der Annahme, dass Zink am Sulfido-Liganden des Molybdäns oder am Cystein³⁸⁸ bzw. Cystein³⁸⁸-Persulfid gebunden vorliegt.

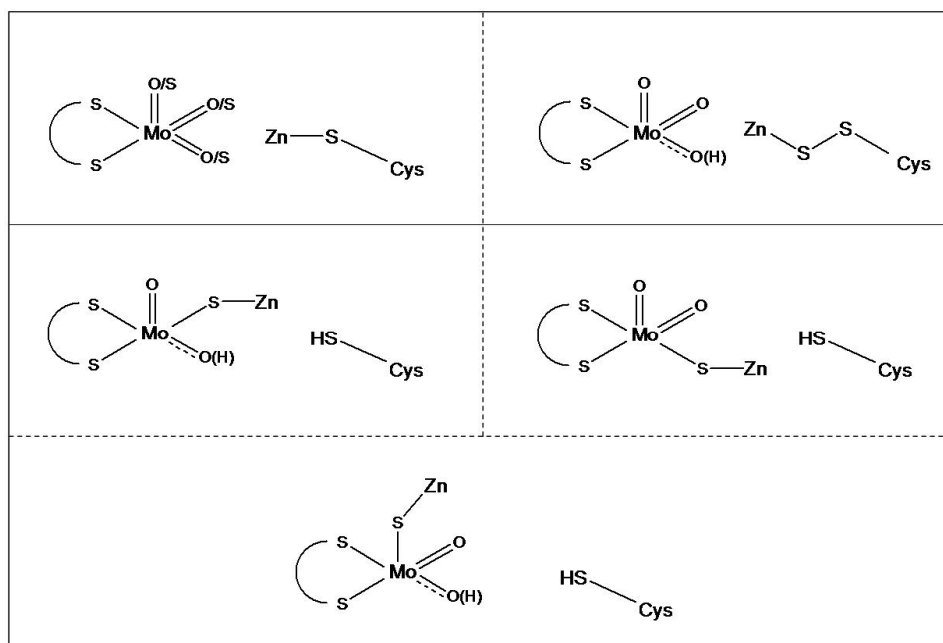


Abbildung 3-23: Hypothetische Strukturen des aktiven Zentrums der CO-Dehydrogenase der *coxF*-Mutante aus *O. carboxidovorans* OM5 unter Annahme eines „kontaminierenden“ Zink-Ions.

Aufgrund der Tatsache, dass sich die CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante lediglich auf eine CO-oxidierende Aktivität von 1,12 U/mg mit Cu(I) rekonstituieren lässt (vgl. Kap. 3.15) wurde untersucht, ob Zn am cyanolysierbaren Schwefel im aktiven Zentrum bindet und daher eine Cu-Rekonstitution verhindern könnte. Dargestellt sind mögliche hypothetische Strukturen, die veranschaulichen, an welchen Positionen innerhalb des aktiven Zentrums Zink gebunden haben könnte. Zunächst wird erkennbar, dass es mehrere potentielle Positionen des cyanolysierbaren Schwefels gibt. Der Schwefel könnte sowohl am Molybdän als auch am Cystein³⁸⁸ in Form eines Persulfides vorliegen. Je nachdem ergeben sich auch für ein mögliches Zn-Ion unterschiedliche Positionen.

Die AAS-Messungen des Enzyms der *coxF*-Mutante ergaben mit $0,076 \pm 0,004$ mol pro mol Enzym allerdings keine Zink-Gehalte, welche die schwache Cu-Rekonstituierbarkeit des Mutanten-Enzyms erklären könnten. Für den CO-chemolithoautotroph gewachsenen Wildtyp konnten mit $0,167 \pm 0,010$ mol pro mol Enzym vergleichbar niedrige Werte erhalten werden. Der Zinkgehalt des CO-induziert gewachsenen Wildtyps lag bei $0,220 \pm 0,0029$ mol pro mol Enzym und damit in der gleichen Größenordnung. Zink-Analysen mittels

Neutronenaktivierungsanalyse bestätigten mit $0,187 \pm 0,003$ mol für das Mutanten-Enzym F::km, $0,061 \pm 0,002$ mol für den CO-chemolithoautotroph gewachsenen Wildtyp und $0,121 \pm 0,003$ mol pro mol Enzym für den CO-induziert gewachsenen Wildtyp den relativ niedrigen Zink-Gehalt in den verschiedenen Präparaten von CO-Dehydrogenase.

Die Bestimmung von Eisen wurde mittels NAA und ICP-MS durchgeführt (Kap. 2.27.3 bzw. 2.27.4). Die ICP-MS Messungen wurden von Herrn Dr. Gunter Ilgen am Bayreuther Zentrum für Ökologie und Umweltforschung (BayCEER, Dr.-Hans-Frisch-Straße 1 - 3, 95448 Bayreuth) durchgeführt. Neutronenaktivierungsanalysen fanden an der Forschungs-Neutronenquelle Heinz Maier-Leibnitz (FRM II) der Technischen Universität München (Lichtenbergstraße 1, 85748 Garching) statt. Die Messungen wurden von Herrn Dr. Xiaosong Li durchgeführt. Die CO-Dehydrogenase besitzt zwei [2Fe-2S]-Zentren, die essentiell für den Elektronentransport bei der Oxidation von CO sind. Die Elektronen werden über das Mo-Zentrum, an welchem sich die Umsetzung von CO zu CO₂ vollzieht, über die Eisen-Schwefel-Zentren zum FAD geleitet. Wildtypische CO-Dehydrogenase besitzt einen theoretischen Wert von 8,0 mol Fe pro mol Protein (Meyer 1982). Die Bestimmung des Fe in der *coxF*-Mutante sollte Aufschluss darüber geben, ob die Mutation in *coxF* eine Auswirkung auf die Eisen-Schwefel-Zentren hat. Als Referenz wurde ein CO-Dehydrogenase-Präparat des Wildtyps von *O. carboxidovorans* OM5 analysiert. Im Vorfeld waren beide Proben zweimal gegen 10 L 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 dialysiert worden, da Kontaminationen von außen aufgrund des häufigen Vorkommens von Eisen (auch in Laborgeräten) sehr leicht in die zu untersuchenden Proben eingebracht werden können. Die ICP-MS-Messungen ergaben für den Wildtyp einen Eisen-Gehalt von $7,78 \pm 0,437$ mol pro Protein, für die *coxF*-Mutante konnten $9,22 \pm 0,805$ mol pro mol Enzym detektiert werden. Trotz des um 15,3 % erhöhten Eisengehaltes im Mutanten-Enzym kann davon ausgegangen werden, dass das Enzym in den Eisen-Schwefel-Zentren den vollständigen Fe-Anteil besitzt. Die Abweichung vom theoretischen Eisen-Gehalt von 8,0 mol pro mol Enzym lässt sich wohl dadurch erklären, dass trotz einer durchgeführten Dialyse Eisen-Verunreinigungen in die Probe eingeschleppt wurden. Die Neutronenaktivierungsanalyse bestätigt den vollständigen Eisen-Anteil, hier konnten $7,57 \pm 0,520$ mol Fe pro mol Protein detektiert werden, was sowohl dem theoretisch zu erwartenden Wert als auch der Messung des Wildtyp-Präparates mit $7,67 \pm 0,521$ mol Fe pro mol Enzym entspricht.

Neben der Bestimmung des cyanolysierbaren Schwefels wurde auch der Gehalt an säurelabilen Schwefel bestimmt. Dieser ist Bestandteil der [2Fe-2S]-Zentren und damit essentiell für die Funktionalität des Enzyms (vgl. Kap. 3.14 und 3.17). Die Quantifizierung des säurelabilen Schwefels erfolgte nach dem Methylenblau-Verfahren nach Fogo and Popowsky (1949). Der Enzymlösung wurde dabei eine Lösung aus Zn-Acetat und Na-Acetat zugesetzt, um den säurelabilen Schwefel als H₂S freizusetzen. Dimethylphenylendiamin wurde mit durch Zugabe einer Fe(III)-Lösung oxidiert und das erhaltene Produkt durch das entstandene H₂S zu Methylenblau umgesetzt. Dieses konnte spektralphotometrisch durch Messung der Extinktion bei 667 nm nachgewiesen werden. Für die Quantifizierung wurde eine Eichgerade mit dem Enzym Xanthin-Oxidase erstellt, welches den säurelabilen Schwefel und FAD im Verhältnis 4 : 1 enthält (Coughlan 1980, Meyer 1982). Bei einer Konzentration von 5,5 µM konnte für die CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante ein Schwefelgehalt von $42,53 \pm 0,907$ µM gemessen werden, was einem Anteil von $7,73 \pm 0,164$ mol pro mol Enzym entspricht. Für den als Referenz herangezogenen Wildtyp konnte bei einer Enzymkonzentration von ebenfalls 5,5 µM ein Schwefelanteil von $39,87 \pm 1,193$ µM ermittelt werden. Dies entspricht einem Gehalt von $7,25 \pm 0,217$ mol pro mol Protein. Die CO-Dehydrogenasen aus der *coxF*-Mutante und aus dem Wildtyp enthalten damit 96,6 % bzw. 90,6 % des theoretischen Schwefelgehaltes von 8,0 mol pro mol Enzym (Meyer 1982; Gremer et al. 2000; Resch et al. 2005).

In der *coxF*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 wird somit eine CO-Dehydrogenase gebildet, die Kupfer-defizient ist, aber weitestgehend komplett im Gehalt an Eisen, Molybdän und säurelabilen, sowie cyanolysierbaren Schwefel ist. Das Enzym weist keine nennenswert erhöhten Selen-Mengen auf, detektiertes Selen kann auf das in geringem Anteil natürlicherweise vorkommende Selenomethionin zurückgeführt werden. Die Ergebnisse sämtlicher Element-Analysen für die CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante sind in Tab. 3-9 zusammenfassend aufgeführt.

Tabelle 3-9: Schwefel-, Selen- und Metallgehalte der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5.

Angaben in mol pro mol CO-Dehydrogenase. Standardabweichungen basieren auf mindestens drei unabhängigen Bestimmungen. n.b., nicht bestimmt

	Schwefel (cyanolysierbar)	Schwefel (säurelabil)	Kupfer	Selen	Molybdän	Eisen	Zink
chemische Analyse	1,40 ± 0,129	7,73 ± 0,164	0,046 ± 0,001	0,309 ± 0,116	1,86 ± 0,062	n.b.	n.b.
AAS	n.b.	n.b.	0,043 ± 0,004	n.b.	1,85 ± 0,031	n.b.	0,076 ± 0,004
ICP-MS	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	1,76 ± 0,005	9,22 ± 0,805	n.b.
NAA	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	1,84 ± 0,120	7,57 ± 0,520	0,187 ± 0,003

Wie die CoxE-Mutante (Dr. A. Pelzmann, persönliche Mitteilung) ist somit auch die CoxF-Mutante aus *O. carboxidovorans* OM5 Kupfer-defizient, weist aber 70 % des cyanolysierbaren Schwefels eines vollbesetzten Wildtyp-Enzyms auf. Der Schwefel könnte hier sowohl in Form eines Sulfido-Liganden am Mo als auch als persulfidischer Schwefel am Cystein³⁸⁸ vorliegen – beide wären cyanolysierbar und würden bei der Schwefelbestimmung detektiert werden (Flavin 1962; Wood 1987). Cystein-Persulfide stellen dabei zumeist eine aktivierte Schwefel-Spezies dar, welche aufgrund ihrer Instabilität normalerweise nur transient gebildet werden (Kessler 2006). Sie dienen als Schwefelquelle für Fe-S-Cluster, Thionukleoside, Molybdopterin oder Fettsäuren und werden u.a. von Cystein-desulfurierenden Enzymen wie NifS, SufS oder Rhodanese-ähnlichen Proteinen gebildet. (Zheng et al. 1993; Ray et al. 2000; Ollagnier de Choudens et al. 2003).

Der Kupfergehalt, der im Mittel bei 0,045 mol pro mol Enzym liegt, entspricht lediglich 2,3 % eines vollbesetzten Wildtyp-Präparates, kann aber als Erklärung der geringen CO-oxidierenden Aktivität herangezogen werden. Meyer et al. (2000) waren in der Lage ein Enzympräparat mit einer Aktivität von 23 U/mg aus *O. carboxidovorans* OM5 aufzureinigen. Der Kupfergehalt dieses Präparates betrug 1,96 mol pro mol Enzym. Gemessen an der Aktivität dieses Wildtyp-Enzyms beträgt die CO-oxidierende Aktivität der CO-Dehydrogenase aus der CoxF-Mutante 0,59 %, was größenordnungsmäßig dem Kupfergehalt entspricht.

In der *coxG*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 wird dagegen eine aktive, vollständig assemblierte CO-Dehydrogenase gebildet. Das aufgereinigte Enzym besitzt eine CO-oxidierende Aktivität von 4,36 U/mg (Hager 2011). Dies entspricht 19,0 % der Aktivität des Wildtyp-Enzyms mit 23 U/mg. Der wesentliche Unterschied zur *coxF*-Mutante besteht v.a. in den im Mittel detektierten 1,77 mol Cu pro mol Enzym. Dies suggeriert, dass CoxF maßgeblich an der Kupfer-Inkorporation in das aktive Zentrum beteiligt ist. Die Ergebnisse der verschiedenen Element-Analysen (chemisch und über AAS) für das Präparat aus der *coxG*-Mutante können Tab. 3-10 entnommen werden.

Tabelle 3-10: Schwefel- und Metallgehalte der CO-Dehydrogenase aus der *coxG*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5.

Angaben in mol pro mol CO-Dehydrogenase. Standardabweichungen basieren auf mindestens drei unabhängigen Bestimmungen. Die Daten der chemischen Analysen stammen aus Hager (2011). n.b., nicht bestimmt

	Schwefel (cyanolysierbar)	Kupfer	Molybdän	Zink
chemische Analyse	$2,17 \pm 0,08$	$2,05 \pm 0,013$	$1,87 \pm 0,00$	n.b.
AAS	n.b.	$1,48 \pm 0,078$	$1,91 \pm 0,080$	$0,31 \pm 0,008$

3.14 Im Gegensatz zur *coxG*-Mutante wird in der *coxF*-Mutante eine nicht-funktionelle CO-Dehydrogenase gebildet

Die CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* OM5 zeigt in der UV/VIS-Spektroskopie ein charakteristisches Profil, welches maßgeblich von den [2Fe-2S]-Zentren, dem FAD und dem Mo-Kofaktor stammt (Meyer 1982). Zur Untersuchung der katalytischen Inaktivität des Enzyms aus der *coxF*-Mutante wurde über UV/VIS-Absorptionsspektren analysiert, inwieweit die Redoxaktivität dieser Kofaktoren beeinträchtigt ist. Es wurden Spektren der *coxF*-Mutante, der *coxG*-Mutante sowie wildtypischer Präparate aufgenommen, bei denen *O. carboxidovorans* OM5 sowohl unter CO-chemolithoautotrophen Bedingungen als auch unter CO-induzierenden Bedingungen angezüchtet wurde. Diese Spektren sollten zeigen, ob die Wachstumsbedingungen einen Einfluss auf die Synthese von CO-Dehydrogenase haben. Alle Spektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 230 bis 800 nm aufgenommen und sind in Abb. 3-24 dargestellt. Im luftoxidierten Zustand waren die UV/VIS-Spektren der

verschiedenen CO-Dehydrogenase-Präparate nahezu ununterscheidbar und entsprachen denen eines typischen Wildtyp-Präparates bzw. Molybdo-Eisen-Schwefel-Flavo-Proteins (Meyer 1982; Gremer et al. 2000; Dobbek et al. 2002). So zeigten die Spektren einen Protein-Peak im Bereich 280 nm, ein Absorptionsminimum bei 310 nm, ein Maximum im Bereich 330 nm, eine Schulter bei 380 nm, ein weiteres Absorptionsminimum im Bereich 405 nm, ein Maximum bei 450 nm sowie eine Schulter bei 550 nm (Abb. 3-24).

Das Absorptionsmaximum bei 450 nm ist charakteristisch für das gebundene FAD, die Schulter bei 550 nm für die [2Fe-2S]-Zentren des Enzyms. Reinheit und Kofaktor-Gehalt lassen sich durch den Quotienten aus distinkten Absorptionsbanden bestimmen. Verunreinigungen mit Fremdprotein oder ein Verlust an FAD können durch das Verhältnis $A_{280} : A_{450}$ ermittelt werden. Für Molybdän-Hydroxylasen konnte als bisher bester Wert ein Quotient von 4,8 erhalten werden (Waud 1975; Coughlan 1980). Dennoch lag für hoch-reine CO-Dehydrogenase das Absorptionsverhältnis generell in einem Größenbereich von 6,0 (Meyer 1982), was sich mit den Werten der betrachteten Präparate deckt (Tab. 3-11). Der Quotient $A_{450} : A_{550}$ gibt das Verhältnis von FAD zu den Eisen-Schwefel-Zentren wieder. Die erhaltenen Werte sind in Tab. 3-11 aufgeführt und liegen zwischen 2,7 - 3,2. Dies zeigt, dass alle Enzym-Präparate im Gehalt an FAD und den Eisen-Schwefel-Zentren vollständig sind. Das Verhältnis FeS / FAD beträgt annähernd 4 : 1, charakteristisch für eine funktionelle CO-Dehydrogenase (Rajagopalan und Handler 1964; Coughlan 1980; Meyer 1982).

Wird den Enzym-Präparaten ein Reduktionsmittel wie Na-Dithionit zugegeben, kommt es zur Reduktion chromophorer und redoxaktiver Gruppen, allen voran der Eisen-Schwefel-Zentren und des FAD, was sich in einer „Ausbleichung“ der Absorption im Bereich von 370 bis 600 nm äußert (Abb. 3-24). Diese direkte Reduktion konnte für alle Präparate beobachtet werden. Die CO-Dehydrogenasen aus der *coxF*- und der *coxG*-Mutante waren diesbezüglich ununterscheidbar von den beiden Wildtyp-Präparaten, so dass davon auszugehen ist, dass sowohl die [2Fe-2S]-Zentren als auch das FAD redoxaktiv und funktionell sind.

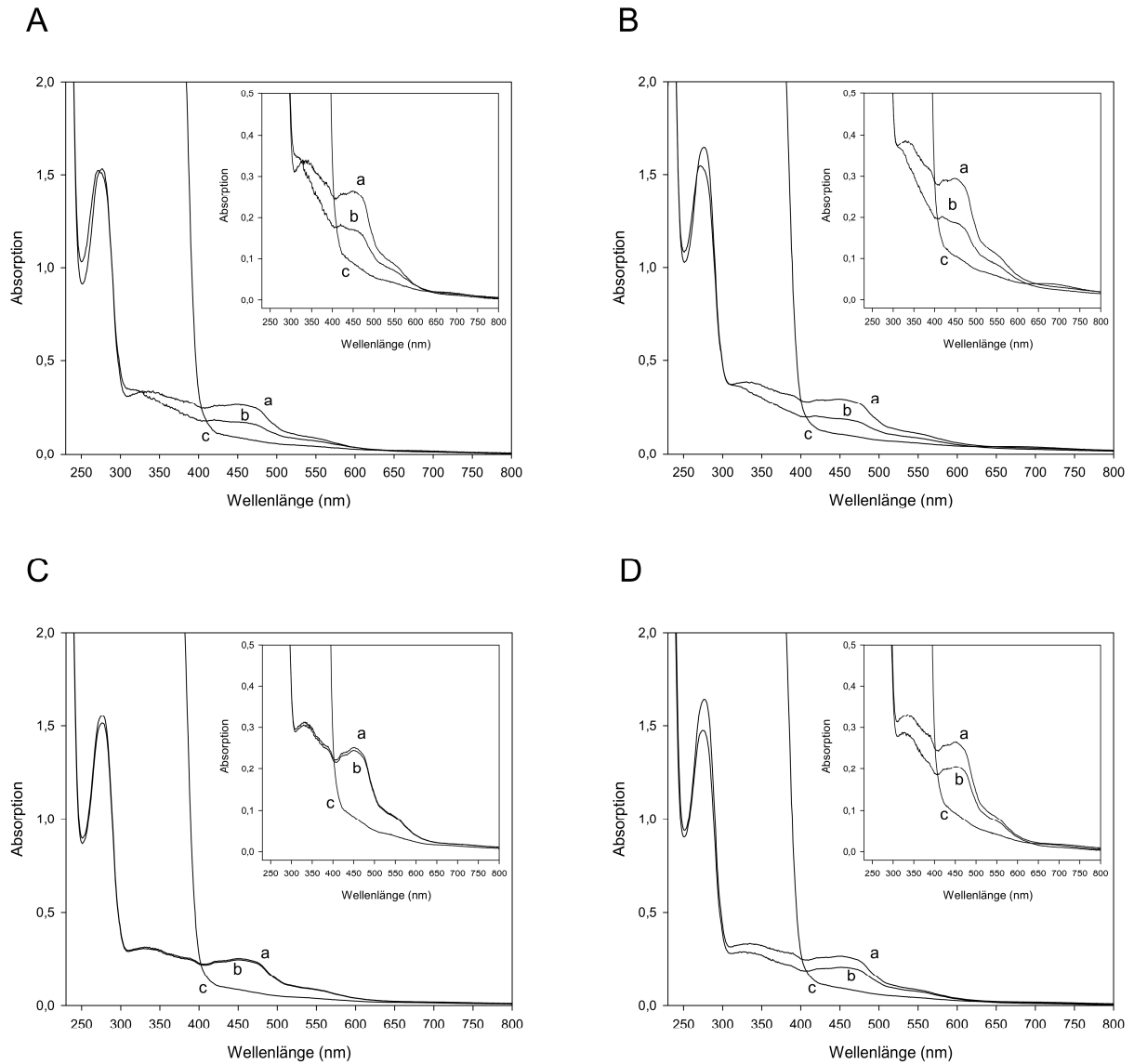


Abbildung 3-24: UV/VIS-Absorptionsspektren der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*- und der *coxG*-Mutante, sowie dem Wildtyp von *O. carboxidovorans* OM5.

(A) UV/VIS-Absorptionsspektrum der CO-Dehydrogenase (1,2 mg/ml) eines CO-chemolithoautotroph gewachsenen Wildtyps von *O. carboxidovorans* OM5. *Inset*: Ausschnittsvergrößerung im Bereich 230 bis 800 nm. Spektrum *a* zeigt den luftoxidierten Zustand des Präparates, Spektrum *b* das Enzym nach 30 min Begasung mit 100 % CO unter anoxischen Bedingungen und Spektrum *c* das Präparat nach Reduktion mit 500 μ M Na-Dithionit unter anoxischen Bedingungen (Inkubation 10 min). Unter gleichen Bedingungen wurden Spektren eines CO-Dehydrogenase-Präparates aus *O. carboxidovorans* OM5 aufgenommen, welcher unter einer $H_2/CO_2/CO/O_2$ -Atmosphäre angezüchtet wurde (B), sowie Spektren der Enzyme aus der *coxF*- (C) und *coxG*-Mutante (D).

Des Weiteren können redoxaktive Komponenten der Wildtyp-Enzyme durch Inkubation mit CO in Abwesenheit weiterer externer Elektronenakzeptoren zumindest teilweise reduziert werden (Meyer 1982; Dobbek et al. 2002; Pelzmann et al. 2009). Dies zeigte sich auch für die beiden getesteten Wildtyp-Präparate (Abb. 3-24, A und B, Spektrum *b*). Hier kam es zu einer merklichen „Ausbleichung“ der Absorptionsmaxima bei 450 und 550 nm. Auch das Mutanten-Enzym aus *O. carboxidovorans* OM5 G::km kann auf diese Weise (teil-)reduziert werden (Abb. 3-24, D, Spektrum *b*). Diese Beobachtung deckt sich damit, dass es sich bei der CO-Dehydrogenase aus der *coxG*-Mutante um ein aktives Enzym handelt. Das Präparat aus der *coxF*-Mutante konnte dagegen durch CO nicht reduziert werden. Das aufgenommene Spektrum entsprach dem im Luft-oxidierten Zustand (Abb. 3-24, C, Spektrum *b*). Somit kann im Gegensatz zur *coxG*-Mutante in der *coxF*-Mutante kein Transfer von Elektronen auf die redoxaktiven Kofaktoren stattfinden. Aktivitätstest bestätigen diese Ergebnisse, hier konnte nur eine relativ geringe CO-oxidierende Aktivität von 0,136 U/mg bestimmt werden (Kap. 3.13). Insgesamt zeigt die Überprüfung aber, dass Mutationen in den Genen *coxF* und *coxG* keinen Effekt auf die Funktionalität der Eisen-Schwefel-Zentren und des FAD-Kofaktors haben.

Die geringe Aktivität der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante könnte allerdings auch der Grund dafür sein, dass das Spektrum nach 30 min CO-Inkubation vom Luft-oxidierten Spektrum nicht unterscheidbar ist. Geht man von der Annahme aus, dass es sich bei der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante um eine konkrete schwach-aktive Enzym-Spezies handelt, würde erst nach wesentlich längerer CO-Inkubation eine Veränderung im Spektrum ersichtlich werden. Zur Untersuchung dieses möglichen Sachverhaltes wurde das Mutanten-Enzym (1 ml, 1,2 mg/ml) über einen Zeitraum von 48 h jeweils halbstündlich in Küvetten aus optischem Spezialglas mit CO begast und zu verschiedenen Zeitpunkten ein Spektrum aufgenommen. Der Vergleich der Spektren untereinander ließ jedoch keinen Unterschied gegenüber dem Ausgangsspektrum erkennen. Daher ist nicht davon auszugehen, dass es sich bei der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante um ein Präparat mit einer konkreten Enzym-Spezies handelt, welche sich durch geringe Aktivität und Funktionalität auszeichnet. Vielmehr deutet das Ergebnis darauf hin, dass der überwiegende Anteil inaktives, nicht funktionelles Enzym darstellt. Nur ein geringer Anteil besitzt einen vollständig assemblierten Cluster im aktiven Zentrum, welcher für die geringe Aktivität verantwortlich ist.

Der Gehalt an FAD wurde zudem chemisch bestimmt (Tab. 3-11). Hierzu wurde der Proteinanteil der jeweiligen CO-Dehydrogenase ausgefällt und abzentrifugiert und die Extinktion des oxidierten Flavins im Überstand photometrisch bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte nach Reduktion mit Na-Dithionit und erneuter Extinktionsmessung. Dabei wurden die Extinktionsdifferenz aus oxidiertem und reduziertem Flavin und der entsprechende Redox-Differenz-Extinktionskoeffizient herangezogen (Kap. 2.28).

Tabelle 3-11: Charakteristische Absorptionsquotienten zur Reinheitskontrolle und zur Ermittlung des Gehalts an Eisen-Schwefel-Zentren und FAD in wildtypischer CO-Dehydrogenase sowie Präparaten der *coxF*- und *coxG*-Mutante. Zusätzlich sind die jeweiligen FAD-Gehalte nach chemischer Bestimmung angegeben.

	FAD (mol / mol Enzym)	A_{280} / A_{450}	A_{450} / A_{550}
Wildtyp (CO/CO ₂ /O ₂)	1,93 ± 0,082	5,69	3,095
Wildtyp (H ₂ /CO ₂ /CO/O ₂)	1,98 ± 0,033	5,48	2,691
F::km (H ₂ /CO ₂ /CO/O ₂)	1,92 ± 0,064	6,07	2,961
G::km (H ₂ /CO ₂ /CO/O ₂)	1,79 ± 0,042	6,14	3,192

3.15 Die CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* OM5 F::km lässt sich zu einem aktiven Enzym rekonstituieren

Element-Analysen der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 zeigten, dass das Enzym gegenüber einem maximal besetzten WT-Präparat (2,0 mol Schwefel pro mol Protein, Gnida et al 2003) zu 70,0 % cyanolysierbaren Schwefel besitzt, aber nahezu kein Cu(I) enthält (Kap. 3.13). Dementsprechend wurde versucht, das aktive Zentrum durch Zugabe eines Cu[SC(NH₂)₂]₃Cl - Komplexes zu komplettieren. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob durch vorherige Behandlung mit Sulfid und Dithionit der Schwefel-Gehalt noch erhöht und die Aktivität nach anschließender Cu[SC(NH₂)₂]₃Cl-Zugabe weiter gesteigert werden kann. Als Referenz dienten Präparate von CO-Dehydrogenase aus dem Wildtyp von *O. carboxidovorans* OM5, welcher sowohl unter CO-chemolithoautotrophen als auch unter CO-induzierten Bedingungen angezogen wurde. Abb. 3-25 zeigt die Aktivitätsverläufe der verschiedenen Rekonstitutionsansätze.

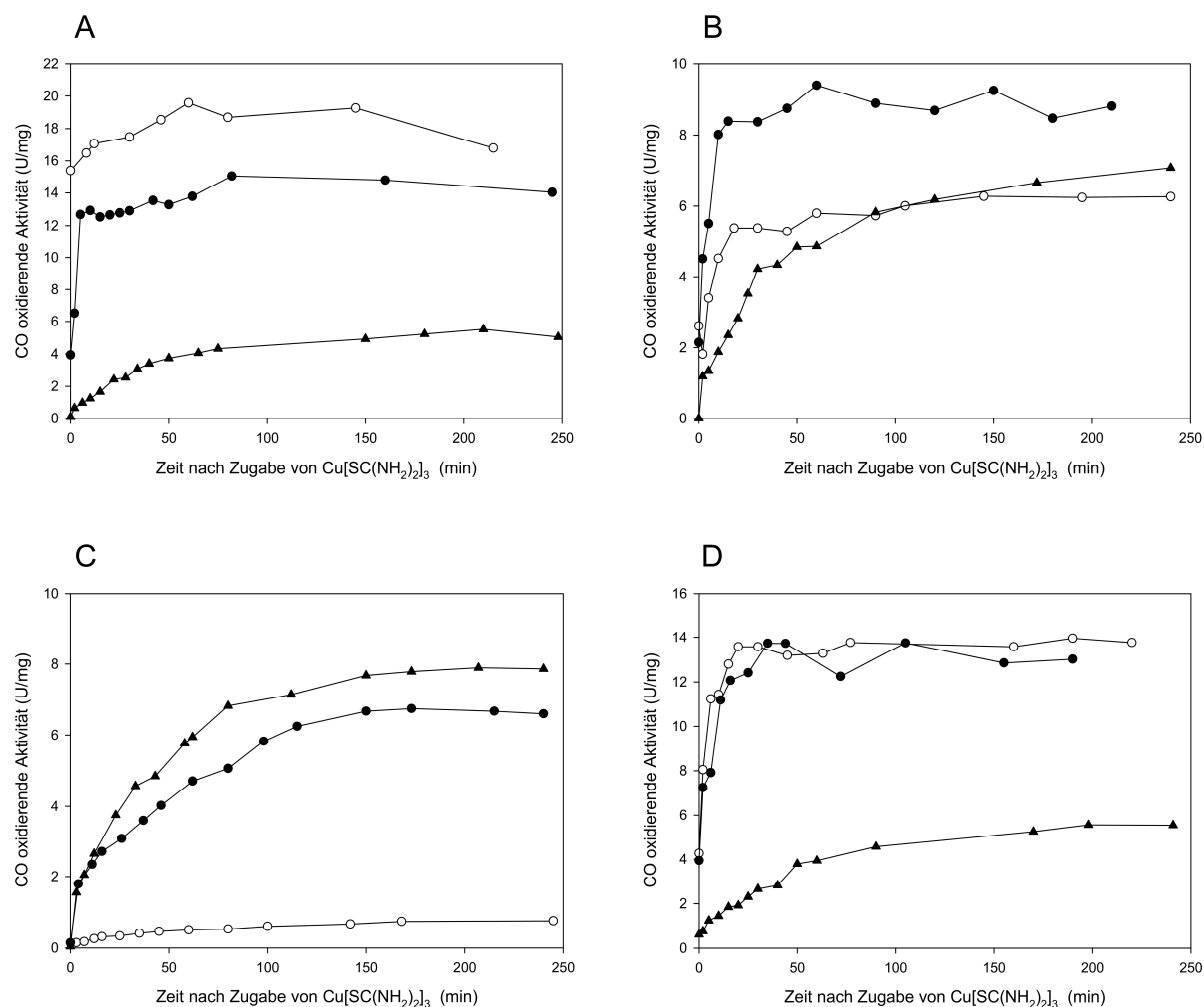


Abbildung 3-25: Funktionelle Rekonstitution des $[\text{CuSMoO}_2]$ -Clusters im aktiven Zentrum verschiedener Spezies von CO-Dehydrogenase.

Die CO-oxidierende Aktivität der CO-Dehydrogenase aus Wildtyp und Mutanten (jeweils 5 mg/ml) wurde nach Behandlung mit 125 μM $\text{Cu}[\text{SC}(\text{NH}_2)_2]_3\text{Cl}$ unter anaeroben Bedingungen analysiert (○), oder nach Behandlung mit Sulfid und Dithionit (jeweils 5 mM) und anschließender Zugabe von 125 μM $\text{Cu}[\text{SC}(\text{NH}_2)_2]_3\text{Cl}$ (●). Desweiteren wurden die Präparate mit 5 mM KCN inaktiviert, und im Anschluss mit Sulfid und Dithionit (jeweils 5 mM) sowie 125 μM $\text{Cu}[\text{SC}(\text{NH}_2)_2]_3\text{Cl}$ reaktiviert (▲).

- (A) CO-Dehydrogenase aus CO-chemolithoautotroph angezogenem Wildtyp.
- (B) CO-Dehydrogenase aus einem unter $\text{H}_2/\text{CO}_2/\text{CO}/\text{O}_2$ induziert gewachsenen Wildtyp.
- (C) CO-Dehydrogenase aus dem Mutantenstamm *O. carboxidovorans* OM5 F::km, angezogen unter einer $\text{H}_2/\text{CO}_2/\text{CO}/\text{O}_2$ -Atmosphäre.
- (D) CO-Dehydrogenase aus dem Mutantenstamm *O. carboxidovorans* OM5 G::km, angezogen unter einer $\text{H}_2/\text{CO}_2/\text{CO}/\text{O}_2$ -Atmosphäre.

Die Aktivität des Wildtyp-Präparates von *O. carboxidovorans* OM5, welcher CO-chemolithoautotroph angezüchtet wurde, konnte zu 15,11 U/mg bestimmt werden (vgl. Abb. 3-25, A). Diese Aktivität konnte durch Zugabe von 125 μM $\text{Cu}[\text{SC}(\text{NH}_2)_2]_3\text{Cl}$ bis auf 19,58 U/mg gesteigert werden. Eine vorherige Sulfurierung mit Sulfid und Dithionit (jeweils 5 mM) setzte die Aktivität zunächst herab, welche dann durch Zugabe von $\text{Cu}[\text{SC}(\text{NH}_2)_2]_3\text{Cl}$ allerdings wieder auf 15,04 U/mg gesteigert werden konnte. Eine Inaktivierung durch KCN (5 mM), der nachfolgende Wiederaufbau des aktiven Zentrums mit Sulfid und Dithionit (jeweils 5 mM) sowie durch die Zugabe von $\text{Cu}[\text{SC}(\text{NH}_2)_2]_3\text{Cl}$ führten zu einer Aktivität von 5,52 U/mg.

Die CO-Dehydrogenase des CO-induziert gewachsenen Wildtyps hatte mit 2,60 U/mg eine wesentlich niedrigere Aktivität als das Präparat des CO-chemolithoautotroph gewachsenen Wildtyps. Dies lässt sich dadurch erklären, dass in letzterem Fall CO als alleinige Energie- und Kohlenstoffquelle verwendet wird und erst durch CO-Dehydrogenase nutzbar wird. Somit ist die Zelle einerseits auf eine hohe Expressionsrate von CO-Dehydrogenase angewiesen, andererseits auf eine hohe Aktivität des Enzyms. Bei CO-induzierten Wachstumsbedingungen wird CO-Dehydrogenase zwar auch gebildet, jedoch nutzt die Zelle über die Expression von Genen des *cbb*- und *hox*-Genclusters den Wasserstoff und das Kohlenstoffdioxid als Energie- bzw. Kohlenstoffquelle – was die Rolle der CO-Dehydrogenase in der Zelle ‚herabstuft‘. Eine absolute Notwendigkeit für die Synthese großer Mengen hoch-aktiver CO-Dehydrogenase besteht somit nicht. Die Zugabe von $\text{Cu}[\text{SC}(\text{NH}_2)_2]_3\text{Cl}$ führt wie auch schon von Resch (2004) beschrieben zunächst zum Absinken der Aktivität. In wässriger Lösung disproportionieren 2 Cu(I) - Ionen zu elementaren Cu^0 und Cu(II). Das teilweise Vorliegen von Cu(II) kann aufgrund seiner denaturierenden und damit inaktivierenden Wirkung die Ursache für den Aktivitätsabfall sein und verdeutlicht die Notwendigkeit eines reduzierenden Milieus, um der Bildung von Cu(II) entgegenzuwirken. In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass CuCl_2 eine inhibierende Wirkung auf die Aktivität der CO-Dehydrogenase besitzt (Meyer 1982; Resch 2004). Im weiteren Verlauf der Cu-Rekonstitution kann dennoch die Aktivität auf 6,27 U/mg gesteigert werden (Abb. 3-25, B, ○). Durch zusätzliche vorherige Sulfurierung mit Sulfid und Dithionit war eine Aktivitätssteigerung auf 9,39 U/mg zu verzeichnen (Abb. 3-25, B, ●). Schwefelanalysen zeigten im Vorfeld, dass dieses Wildtyp-Präparat 1,53 mol Schwefel pro mol Enzym aufweist. Somit kann aus der Aktivitätssteigerung geschlossen werden, dass cyanolysierbarer Schwefel in noch vorhandene $[\text{MoO}_3]$ -Zentren eingebaut wurde und diese durch Cu(I)-Zugabe schließlich zum $[\text{CuSMoO}_2]$ -Cluster komplettiert wurden. Eine vorherige

Inaktivierung des Enzyms durch 5 mM KCN und der nachfolgende schrittweise Aufbau des aktiven Zentrums durch Sulfid/Dithionit und schließlich Cu(I) führten zu einer Aktivität von 7,07 U/mg (Abb. 3-25, B, ▲). Dieser Wert liegt in der Größenordnung der Aktivität des Präparates aus dem CO-chemolithoautotroph gewachsenen Wildtyp (Abb. 3-25, A, ▲).

Da die CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* OM5 F::km nahezu kein Kupfer enthält (0,045 mol pro mol Enzym) wurde zunächst versucht, das aktive Zentrum durch Zugabe eines $\text{Cu}[\text{SC}(\text{NH}_2)_2]_3\text{Cl}$ - Komplexes zu komplettieren. Die Aktivität konnte allerdings nur auf 1,12 U/mg gesteigert werden (Abb. 3-25, C, ○). Eine Rekonstitution mit $\text{Cu}[\text{SC}(\text{NH}_2)_2]_3\text{Cl}$ unter vorheriger Sulfurierung mit Na_2S und DT konnte die Aktivität auf 6,75 U/mg erhöhen (Abb. 3-25, C, ●), obwohl bereits $1,40 \pm 0,129$ mol Schwefel pro mol Enzym vorhanden sind. Behandelt man das arretierte Enzym zunächst mit KCN zur Erzeugung einer $[\text{MoO}_3]$ *active site* und baut diese danach durch Schwefel- und Kupfer-Zugabe auf, erhält man eine Aktivität von 7,89 U/mg (Abb. 3-25, C, ▲). Dieser Wert entspricht dem eines Wildtyp-Präparates, welches gleichermaßen mit KCN behandelt wurde und danach zum aktiven Enzym mit Schwefel und Kupfer aufgebaut wurde (Abb. 3-25, A und B, ▲). Diese Aktivität kann somit als ein im Zuge der Rekonstitution maximal erreichbarer Wert angesehen werden, stellt aber nach dem von Resch et al. (2005) formulierten Reaktionsmechanismus der Rekonstitution nur 50 % der maximal möglichen Aktivität da (vgl. Kap. 1.7). Somit würde eine Kupruierung nach vorheriger Sulfurierung 42,8 % der Aktivität wiederherstellen, eine alleinige Kupruierung allerdings nur 7,1 %.

Die CO-Dehydrogenase aus der *coxG*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 besitzt eine Aktivität von nur 4,36 U/mg, obwohl die Gehalte an cyanolysierbarem Schwefel mit $2,17 \pm 0,08$ mol pro mol Enzym und Cu mit $1,48 \pm 0,078$ mol pro mol Enzym (ermittelt über AAS) einen in hohem Maße vollständig assemblierten $[\text{CuSMoO}_2]$ -Cluster suggerieren. Durch die anaerobe Zugabe eines $\text{Cu}[\text{SC}(\text{NH}_2)_2]_3\text{Cl}$ - Komplexes (125 μM) konnte die Aktivität auf 13,96 U/mg gesteigert werden (Abb. 3-25, D, ○). Dies lässt darauf schließen, dass Cu(I)-defiziente active sites zu einem vollständigen Cluster cupruiert wurden. Eine zusätzliche, vorherige Sulfurierung mit Sulfid und Dithionit führt nach Cu(I)-Zugabe zu einer Aktivität von 13,74 U/mg (Abb. 3-25, D, ●). Dieser Wert entspricht dem der Aktivität nach alleiniger Cupruierung und kann als das alleinige Ergebnis der Cu(I)-Zugabe angesehen werden. Die Schwefel-Zugabe hat hier keinen Einfluss, da das aktive Zentrum bereits vollständig mit Schwefel besetzt ist. Die Rekonstitution nach vorheriger Inaktivierung mit

KCN führte zu einer Aktivität von 5,56 U/mg (Abb. 3-25, D, ▲), was erneut den Aktivitätswerten der gleichermaßen behandelten Wildtyp-Präparate entspricht.

Die Reaktivierbarkeit der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 wurde zusätzlich über nicht-denaturierende PAGE (Kap. 2.17) und anschließende Aktivitätsfärbung auf CO-oxidierende Aktivität (Kap. 2.24.1) bestätigt. Rekonstituierte Enzym-Proben (Cu-rekonstituiert sowie nach KCN/S/Cu-Behandlung) wurden hierfür auf ein nicht-denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Nach durchgeführter Elektrophorese wurde das Gel in einem entsprechenden Testmix bis zum Erscheinen roter Banden inkubiert. Hierbei handelt es sich um Formazan, welches in der unmittelbaren Umgebung des Proteins präzipitiert. Als Referenz wurden auf dem Gel sowohl unbehandelte CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante als auch CO-Dehydrogenase aus dem WT von *O. carboxidovorans* OM5 mitgeführt. Parallel wurde eine weitere PAGE unter identischen Bedingungen durchgeführt und das Gel mittels Coomassie Brilliant Blau zur Visualisierung von Proteinen angefärbt. Beide Gele sind in Abb. 3-26 dargestellt.

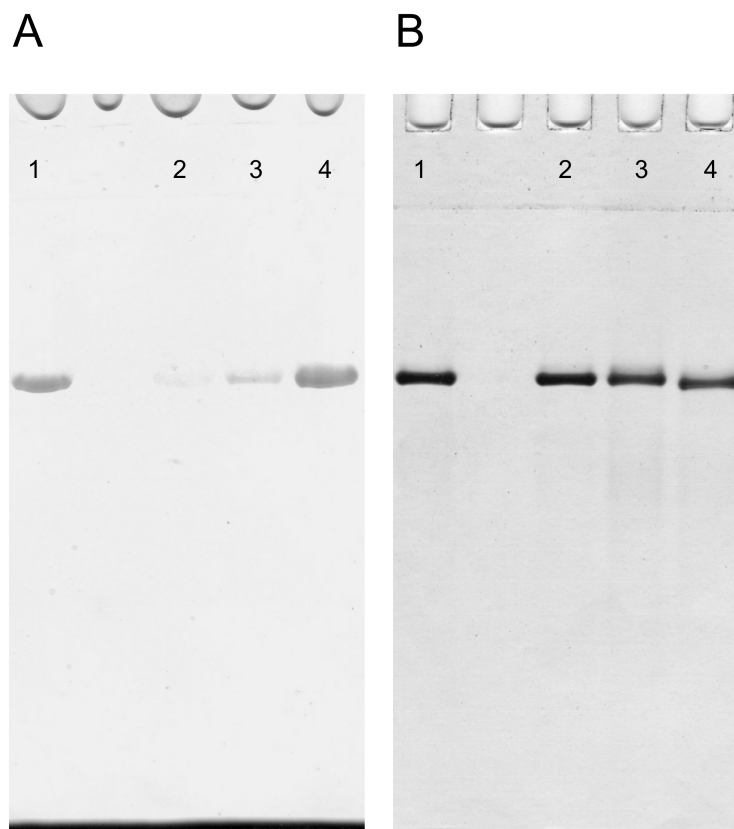


Abbildung 3-26: Nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante nach chemischer Rekonstitution.

Aufgereingte CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante wurde sowohl unbehandelt (Bahn 2) als auch nach verschiedenen chemischen Rekonstitutionen einer nicht-denaturierenden PAGE unterzogen. Dabei wurde das Enzym entweder direkt mit Cu(I) reaktiviert (Bahn 3) oder nach vorheriger KCN-Inaktivierung mit Sulfid/Dithionit und Cu(I) behandelt (Bahn 4) (Kap. 2.29). Als Referenz diente ein CO-Dehydrogenase WT-Präparat (Bahn 1). Für das Mutanten-Enzym (Bahnen 2-4) wurden pro Bahn jeweils 100 µg Protein aufgetragen, für das WT-Enzym (Bahn 1) 40 µg.

- (A) Aktivitätsfärbung des Gels auf CO-oxidierende Aktivität
(B) Proteinfärbung des Gels mit Coomassie Brilliant Blau R-250

Die Proteinfärbung (Abb. 3-26, B) verdeutlicht erneut, dass sämtliche Proben von CO-Dehydrogenase, die aufgetragen wurden, die gleiche Mobilität besitzen. Sowohl das unbehandelte Enzym aus der *coxF*-Mutante (Abb. 3-26, B, Bahn 2) als auch die rekonstituierten Proben (Abb. 3-26, B, Bahn 3 und 4) zeigen ein identisches Laufverhalten wie das WT-Präparat (Abb. 3-26, B, Bahn 1). Dies zeigt erneut, dass die Mutation im Gen *coxF* sich nicht auf die Assemblierung der gebildeten CO-Dehydrogenase auswirkt.

Die Färbung auf CO-oxidierende Aktivität zeigt für das WT-Präparat (Abb. 3-26, A, Bahn 1) eine klare Bande. Für dieses Enzym konnte eine Aktivität von 15,11 U/mg ermittelt werden. Das Enzym der *coxF*-Mutante besitzt nur eine geringe Aktivität von 0,136 U/mg, was sich in der Aktivitätsfärbung des Gels in einer kaum sichtbaren Bande äußert und die geringe Aktivität qualitativ bestätigt (Abb. 3-26, A, Bahn 2). Für das Präparat nach KCN/S/Cu-Rekonstitution kann eine deutliche Bande ausgemacht werden, welche die Reaktivierbarkeit des Enzyms (7,89 U/mg nach Rekonstitution; Abb. 3-25, C, ▲) nach der vollständigen Inaktivierung durch Cyanid bestätigt. Demgegenüber zeigt sich für das Enzym nach alleiniger Cu-Rekonstitution nur eine schwache Bande, die zwar deutlicher ausgeprägt ist als die Bande des unbehandelten Mutantenenzym, aber gegenüber der Bande des WT-Präparats oder des vollständig rekonstituierten Enzyms (KCN/S/Cu) wesentlich schwächer in ihrer Intensität ist (nur 16,3 % nach videodensitometrischer Auswertung).

Für die *coxF*-Mutante aus *O. carboxidovorans* OM5 wurde zudem für die verschiedenen Rekonstitutionsansätze nach jedem Schritt der Gehalt an cyanolysierbaren Schwefel und der Gehalt an Kupfer (über Atomabsorptionsspektroskopie) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 3-12 aufgeführt.

Tabelle 3-12: Gehalt an cyanolysierbarem Schwefel und Kupfer der CO-Dehydrogenase aus dem Mutantenstamm *O. carboxidovorans* OM5 F::km nach Rekonstitution.

Für die verschiedenen Rekonstitutionsansätze (KCN/S/Cu; S/Cu und alleinige Cu(I)-Behandlung) wurde nach jedem Schritt der Gehalt an cyanolysierbarem Schwefel und der Gehalt an Kupfer (über Atomabsorptionsspektroskopie) bestimmt. Alle Werte sind in mol pro mol Enzym angegeben. Standardabweichungen basieren auf mindestens drei unabhängigen Messungen.

Rekonstitution	spezifische Aktivität (U/mg)	S		Cu
		(mol/mol Enzym)		(mol/mol Enzym)
KCN/S/Cu	7,89	$1,57 \pm 0,091^*$	$1,46 \pm 0,261^{**}$	$8,85 \pm 0,095$
S/Cu	6,75	$1,58 \pm 0,078^*$	$1,05 \pm 0,104^{**}$	$8,41 \pm 0,045$
Cu	1,12	$1,40 \pm 0,129^*$	$1,02 \pm 0,035^{**}$	$11,60 \pm 0,083$

* vor Cu(I)-Zugabe

** nach Cu(I)-Zugabe

Die aufgereinigte CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante hatte einen Gehalt an cyanolysierbarem Schwefel von $1,40 \pm 0,129$ mol pro mol Enzym. Der Molybdängehalt konnte zu 1,86 mol pro mol Enzym bestimmt werden. Dies zeigt, dass – gemessen am Molybdängehalt und unter der Annahme, dass nur die „passende“ äquatoriale Position am Molybdän mit Schwefel besetzt wird – cyanolysierbarer Schwefel lediglich zu 75,7 % vorhanden ist. Die Behandlung mit KCN führt zur vollständigen Inaktivierung des Enzyms und erzeugt ein $[\text{MoO}_3]$ -Ion im aktiven Zentrum (Resch et al. 2005; Pelzmann et al. 2009). Cyanolysierbarer Schwefel wird nahezu vollständig entfernt. Eine nachfolgende Sulfurierung mit Sulfid und Dithionit führte jedoch zu keinem wesentlich erhöhten Schwefeleinbau, der Schwefelgehalt betrug $1,565 \pm 0,091$ mol pro mol Enzym und lag damit lediglich 11,7 % über dem Ursprungswert (Tab. 3-12). Nach Inkubation mit dem Kupfer-Thioharnstoff-Komplex und der Abtrennung überschüssiger Reaktanten reduzierte sich der Schwefelgehalt geringfügig auf $1,455 \pm 0,261$ mol pro mol Enzym, was dem Ausgangswert entspricht. Über Atomabsorptionsspektroskopie wurde der Cu-Gehalt zu $8,848 \pm 0,095$ mol pro mol Enzym bestimmt. Der Wert zeigt, dass neben dem „Einbau“ von Cu(I) ins aktive Zentrum zum Aufbau des $[\text{CuSMoO}_2]$ -Clusters weiteres Kupfer vom Enzym gebunden wird. CO-Dehydrogenase besitzt insgesamt 44 Cysteine, 22 pro Heterotrimer, von denen 14 an oder nahe der Oberfläche des Enzyms lokalisiert sind. Diese Cysteine sowie auch Histidine (40 pro Heterotrimer) und Methionine (47 pro Heterotrimer) kommen ebenfalls für die Bindung von Cu(I) in Frage (Rubino et al. 2010), sofern sie im Bereich der Oberfläche zugänglich sind.

Eine direkte Sulfurierung des aufgereinigten Enzyms aus der *coxF*-Mutante führt ebenfalls nur zu einer geringen Erhöhung des Schwefelgehaltes. Der Wert von $1,583 \pm 0,078$ mol pro mol Enzym (Tab. 3-12) entspricht dem Schwefelgehalt des KCN-behandelten Ansatzes nach Sulfurierung und liegt 13,1 % über dem Ausgangswert. Die Zugabe von $\text{Cu}[\text{SC}(\text{NH}_2)_2]_3\text{Cl}$ führt hier allerdings zu einer Reduzierung des Schwefelgehaltes auf $1,050 \pm 0,104$ mol pro mol Enzym. Dennoch kommt es im Zuge dieser Rekonstitution zu einer Aktivitätssteigerung auf 6,75 U/mg (Abb. 3-25, C, ●). Der Cu-Gehalt beträgt nach Rekonstitution $8,405 \pm 0,045$ mol pro mol Enzym (Tab. 3-12), was dem Wert des KCN/S/Cu-Ansatzes entspricht und erneut durch unspezifische Bindung von Kupfer an die Aminosäuren an der Oberfläche des Proteins erklärt werden kann.

Eine alleinige Cupruierung mit 125 μM Kupfer-Thioharnstoff-Komplex führt wie beim S/Cu-Ansatz ebenfalls zu einer Reduzierung des Schwefelgehaltes. Nach Cu(I)-Zugabe fällt der Schwefel-Wert von anfänglich $1,40 \pm 0,129$ mol pro mol Enzym auf $1,015 \pm 0,035$ mol pro mol Enzym, der Kupfergehalt beträgt nach Rekonstitution $11,60 \pm 0,083$ mol pro mol Enzym (Tab 3-12).

Die Resultate der Rekonstitutionsansätze lassen darauf schließen, dass in der aufgereinigten CO-Dehydrogenase der *coxF*-Mutante ein „inkompetenter“ cyanolysierbarer Schwefel vorliegt. Dieser kann durch KCN-Behandlung entfernt werden, so dass durch Sulfurierung mit Sulfid und Dithionit und anschließender Kupruierung der $[\text{CuSMoO}_2]$ -Cluster wieder aufgebaut werden kann und ein aktives Enzym erhalten wird. Dass durch Sulfurierung und Kupruierung 85,6 % der Aktivität des Cyanid-behandelten Enzyms erlangt werden können, würde auf einen hohen $[\text{MoO}_3]$ -Anteil im Präparat schließen lassen, welcher analog zum KCN-inaktivierten Enzym schrittweise zum bimetallischen Cluster rekonstituiert werden kann. Die alleinige Cu(I)-Zugabe rekonstituiert nur jene Enzym-Spezies mit kompetentem Schwefel. Die erlangte Aktivität von 1,12 U/mg repräsentiert damit den Anteil an Enzym mit kompetentem Schwefel, welcher 14,2 % beträgt (gemessen an der Aktivität des KCN-behandelten Ansatzes).

Des Weiteren zeigt sich, dass der über Sulfid und Dithionit eingebaute cyanolysierbare Schwefel „unempfindlich“ gegenüber der Behandlung mit $\text{Cu}[\text{SC}(\text{NH}_2)_2]_3\text{Cl}$ ist. Wird nach KCN-Behandlung das aktive Zentrum stufenweise neu aufgebaut, so verändert sich der Schwefelgehalt nach Cu(I)-Zugabe nur unwesentlich (Tab. 3-12). Die Inkubation mit $\text{Cu}[\text{SC}(\text{NH}_2)_2]_3\text{Cl}$ führt bei Ansätzen, die bereits Schwefel enthalten (Ansätze „S/Cu“ und „Cu“), dagegen zu einer Reduzierung des Schwefelgehaltes auf 66,5 % (Ansatz „S/Cu“) bzw.

72,9 % (Ansatz „Cu“) des Ausgangswertes. Dieser Verlust kann dadurch erklärt werden, dass es im Zuge der Inkubation mit dem Kupfer-Thioharnstoff-Komplex zur Bildung von Kupfersulfiden (CuS und Cu₂S) kommt (Resch et al. 2005).

Somit kann angenommen werden, dass ohne den „Verlust“ an cyanolysierbaren Schwefel noch durchaus höhere Aktivitäten bei den entsprechenden Rekonstitutionsansätzen erreicht werden könnten. Im Zuge der Sulfurierung und Cupruierung des aufgereinigten Enzyms wird eine Aktivität von 6,75 U/mg erreicht, bei einem Schwefelgehalt von 1,05 mol pro mol Enzym. Ein Enzym, das den vollen Gehalt von 2,0 mol Schwefel pro mol Enzym besitzt dürfte damit bei der Rekonstitution eine Aktivität von 12,86 U/mg erlangen.

Die CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante besitzt nahezu keine Funktionalität, das Luft-oxidierte und CO-reduzierte Spektrum sind ununterscheidbar und liegen direkt übereinander (Abb. 3-24, C, Spur *a* und *b*). Die Ursache für diese fehlende Funktionalität ist auf die unvollständige Assemblierung des aktiven Zentrums zurückzuführen. Wie bereits in Kap. 3.14 beschrieben, sind die Eisen-Schwefel-Zentrum sowie auch das FAD redoxaktiv und funktionell. Im Zuge der chemischen Rekonstitution des aktiven Zentrums der CO-Dehydrogenase zu einem funktionellen [CuSMoO₂]-Cluster und der Wiedererlangung der CO-oxidierenden Aktivität sollte auch ein Anstieg der Funktionalität des Enzyms messbar sein.

Das Mutantenzym wurde zunächst wie unter Kap. 2.29.3 durch die Inkubation mit Cu[SC(NH₂)₂]₃Cl in Gegenwart von Ascorbinsäure Cu-rekonstituiert. Im Anschluss wurden ein Luft-oxidiertes Spektrum, ein Spektrum nach 30 min Begasung mit 100 % CO und ein Spektrum nach Reduktion mit Na-Dithionit (letztere jeweils unter anoxischen Bedingungen) aufgenommen (Abb. 3-27, B). Anhand der gemessenen Absorptionswerte bei 450 nm konnte eine Funktionalität von 35,2 % berechnet werden. Gemessen an der Steigerung der CO-oxidierenden Aktivität auf 1,12 U/mg erscheint die Funktionalität des rekonstituierten Enzyms relativ hoch, allerdings konnte bereits an Wildtyp-Präparaten gezeigt werden, dass die Funktionalität nicht zwangsläufig mit der Aktivität korreliert. Dobbek et al. (2002) konnten für ein Präparat mit 23,2 U/mg Aktivität eine Funktionalität von 94 % bestimmen, der Kupfer-Gehalt dieses Enzyms betrug $1,96 \pm 0,08$ mol pro mol Enzym. Demgegenüber besaßen die von Schock (2012) charakterisierten Enzym-Proben mit Aktivitäten von 12,0 U/mg und 2,0 U/mg nur 61,8 % bzw. 36,0 % Funktionalität. Bei einem direkten Zusammenhang zwischen Aktivität und Funktionalität würde man bei diesen Präparaten (im

Vergleich mit dem 23,2 U/mg-Präparat) bei den gegebenen Funktionalitäten wesentlich höhere Aktivitäten mit 15,0 U/mg bzw. 8,80 U/mg erwarten. Rekonstitutionsexperimente mit den erwähnten Präparaten bestätigten diesen Sachverhalt. Durch Inkubation mit dem Cu(I)-Thioharnstoff-Komplex als auch nach vorheriger Behandlung mit Na₂S/DT konnten Aktivitätssteigerungen erzielt werden, die allerdings größer waren, als man es anhand der Funktionalitäten der rekonstituierten Ansätze erwarten würde (Schock 2012).

Es ist nach Cu-Rekonstitution davon auszugehen, dass aufgrund des bereits beschriebenen „inkompetenten“ Schwefels der Cluster eines nur geringen Teils des Präparates mit Cu(I) vervollständigt werden kann. Unter der Annahme, dass sich das F::km-Präparat als ein Gemisch verschiedener Spezies darstellt wird nur der Teil mit Cu rekonstituiert, der einen kompetenten Schwefel an der „richtigen“ äquatorialen Position besitzt. Nach Inkorporation des Cu(I) setzt diese Spezies CO allerdings sehr effektiv um, was sich in der relativ hohen Funktionalität widerspiegelt.

Wird die CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante vor der Cu-Rekonstitution mit Sulfid in Gegenwart von Dithionit behandelt, so ist eine Aktivitätssteigerung auf 6,75 U/mg zu beobachten (Abb. 3-25, C, ●). In analoger Weise wurden auch von diesem Rekonstitutionsansatz Spektren aufgenommen (Abb. 3-27, C) und über die Absorption bei 450 nm die Funktionalität berechnet. Hierbei kann ein Ansteigen der Funktionalität auf 42,34 % ermittelt werden.

Wird das Enzym vor der Sulfurierung und der anschließenden Cupruierung durch Behandlung mit Cyanid inaktiviert (Abb. 3-27, D), so kann über die A₄₅₀-Werte dieses Ansatzes eine Funktionalität von 25,3 % bestimmt werden. Der Vergleich des Rekonstitutionsansatzes mit Sulfurierung und Cupruierung und des Ansatzes mit vorheriger Cyanid-Inaktivierung zeigen damit erneut, dass die CO-oxidierende Aktivität nicht zwangsläufig mit der Funktionalität korrelieren muss. In beiden Ansätzen kann durch die verschiedenen Rekonstitutionsschritte eine ähnlich hohe Aktivität (6,75 U/mg bzw. 7,89 U/mg) erreicht werden, die zugehörigen Funktionalitäten zeigen dagegen einen deutlichen Unterschied (42,34 % bzw. 25,30 %). Zu berücksichtigen ist darüber hinaus der Gehalt an cyanolysierbaren Schwefel in den rekonstituierten Enzymen. Wird das Enzym zu Beginn mit Cyanid inaktiviert und das aktive Zentrum danach stufenweise aufgebaut, so sind $1,455 \pm 0,261$ mol Schwefel pro mol Protein nachweisbar (vgl. Tab. 3-12). Dieser Wert entspricht dem ursprünglichen, unbehandelten Enzym der *coxF*-Mutante. Wird das Enzym direkt mit Schwefel und Kupfer rekonstituiert ohne vorherige Inaktivierung, so können nach der Cupruierung nur $1,050 \pm 0,104$ mol Schwefel pro mol Enzym gemessen werden. Trotz

dieses geringeren Schwefelgehaltes kann in diesem Ansatz die höchste Funktionalität erhalten werden.

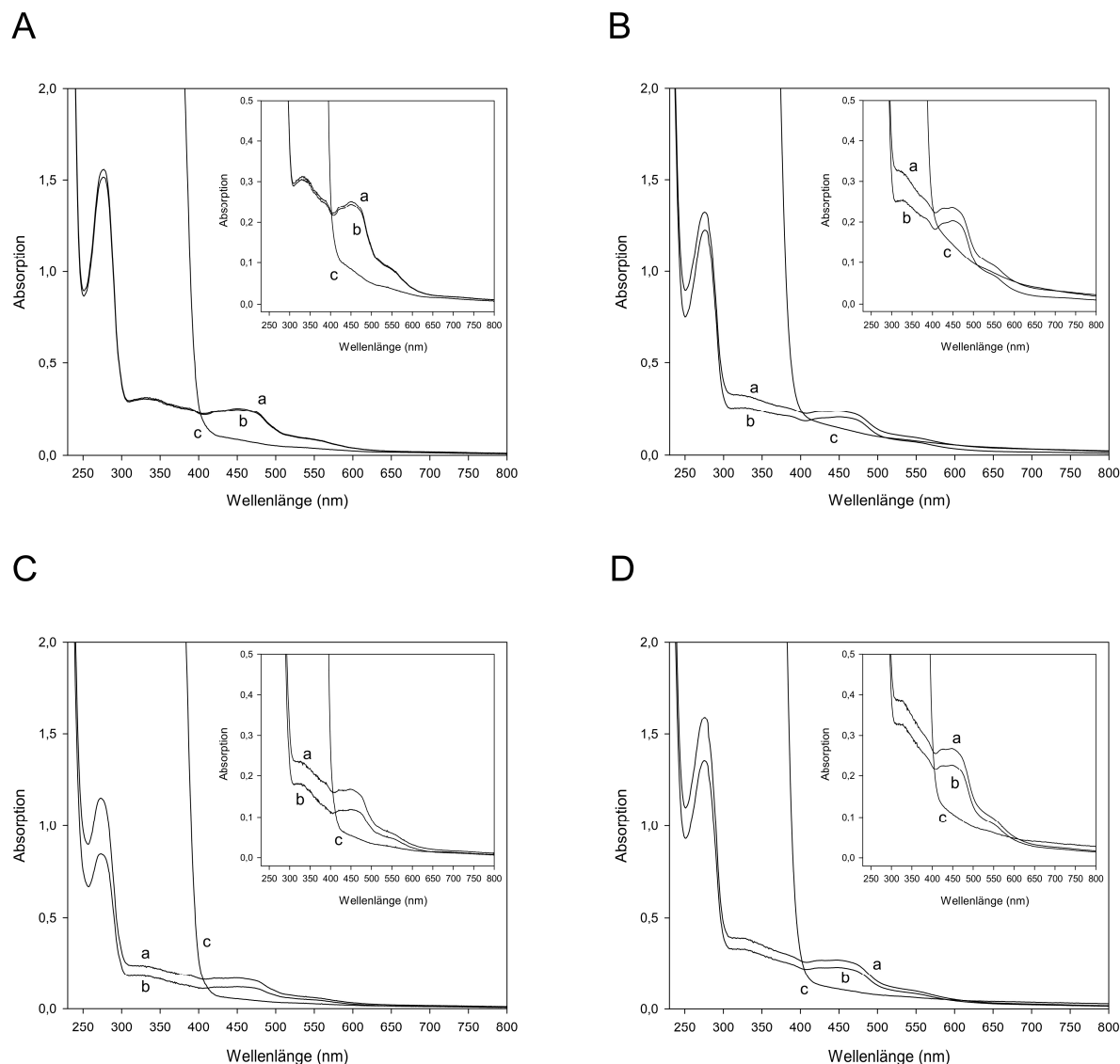


Abbildung 3-27: UV/VIS-Absorptionsspektren von verschiedenen Rekonstitutionsansätzen der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5.

UV/VIS-Absorptionsspektrum der CO-Dehydrogenase (1,2 mg/ml) des Mutantenstammes *O. carboxidovorans* OM5 F::km, angezüchtet unter CO-induzierten Bedingungen (A). *Inset*: Ausschnittsvergrößerung im Bereich 230 bis 800 nm. Spektrum *a* zeigt das Enzym im luftoxidierten Zustand, Spektrum *b* das Enzym nach Begasung mit 100 % CO für 30 min unter anoxischen Bedingungen und Spektrum *c* das Enzym nach Reduktion mit 500 µM Na-Dithionit unter anoxischen Bedingungen (Inkubationszeit 10 min). Unter gleichen Bedingungen wurden Spektren des Mutantenstammes nach Cu-Rekonstitution mit 125 µM Cu[SC(NH₂)₂]₃Cl in Gegenwart von Ascorbinsäure aufgenommen (B), nach Behandlung mit 5 mM Na-Sulfid in Gegenwart von 5 mM Na-Dithionit und anschließender Cu-Rekonstitution (C) sowie nach Inaktivierung mit 5 mM KCN und anschließender Sulfurierung und Cupruierung (D) (Kap. 2.29).

3.16 Die Rekonstituierbarkeit der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 ist abhängig vom verwendeten Puffersystem und dessen pH-Wert

Resch (2004) konnte bereits zeigen, dass die anaerobe Aktivierung von nativer CO-Dehydrogenase mit $\text{Cu}[\text{SC}(\text{NH}_2)_2]_3\text{Cl}$ in Gegenwart von Ascorbinsäure vom pH-Wert des verwendeten Puffersystems abhängt. Hierbei zeigten sich zwei gegensätzliche Einflüsse des pH-Wertes: Zum einen erfolgte die Aktivierung umso schneller, je niedriger der pH-Wert des Puffersystems gewählt wurde, zum anderen begünstigte ein niedrigerer pH-Wert die Oxidation von Metallen, wodurch es parallel zur Aktivierung zu einem inaktivierenden Effekt kam und die maximale Aktivität nicht mehr erreicht werden konnte.

Ein Einfluss des verwendeten Puffersystems und des pH-Wertes auf die Rekonstituierbarkeit und die Aktivität konnte auch für die aufgereinigte CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 gezeigt werden.

Mittels Gelfiltration an einer PD-10 Säule wurde die arretierte CO-Dehydrogenase in 50 mM Tris/HCl pH 8,2, 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 sowie in 50 mM KH_2PO_4 /NaOH pH 7,2 umgepuffert. Jedes Präparat wurde sowohl mit 125 μM $\text{Cu}[\text{SC}(\text{NH}_2)_2]_3\text{Cl}$ rekonstituiert als auch mit $\text{Cu}[\text{SC}(\text{NH}_2)_2]_3\text{Cl}$ nach vorheriger Behandlung mit Sulfid/Dithionit (jeweils 5 mM). Zudem wurde in allen Präparaten das aktive Zentrum nach KCN-Inaktivierung stufenweise durch S- und Cu(I)-Zugabe wieder aufgebaut. Die Aktivitätsverläufe der verschiedenen Rekonstitutionsansätze sind in Abb. 3-28 dargestellt, in Tab. 3-13 sind die erhaltenen Aktivitäten zusammengestellt.

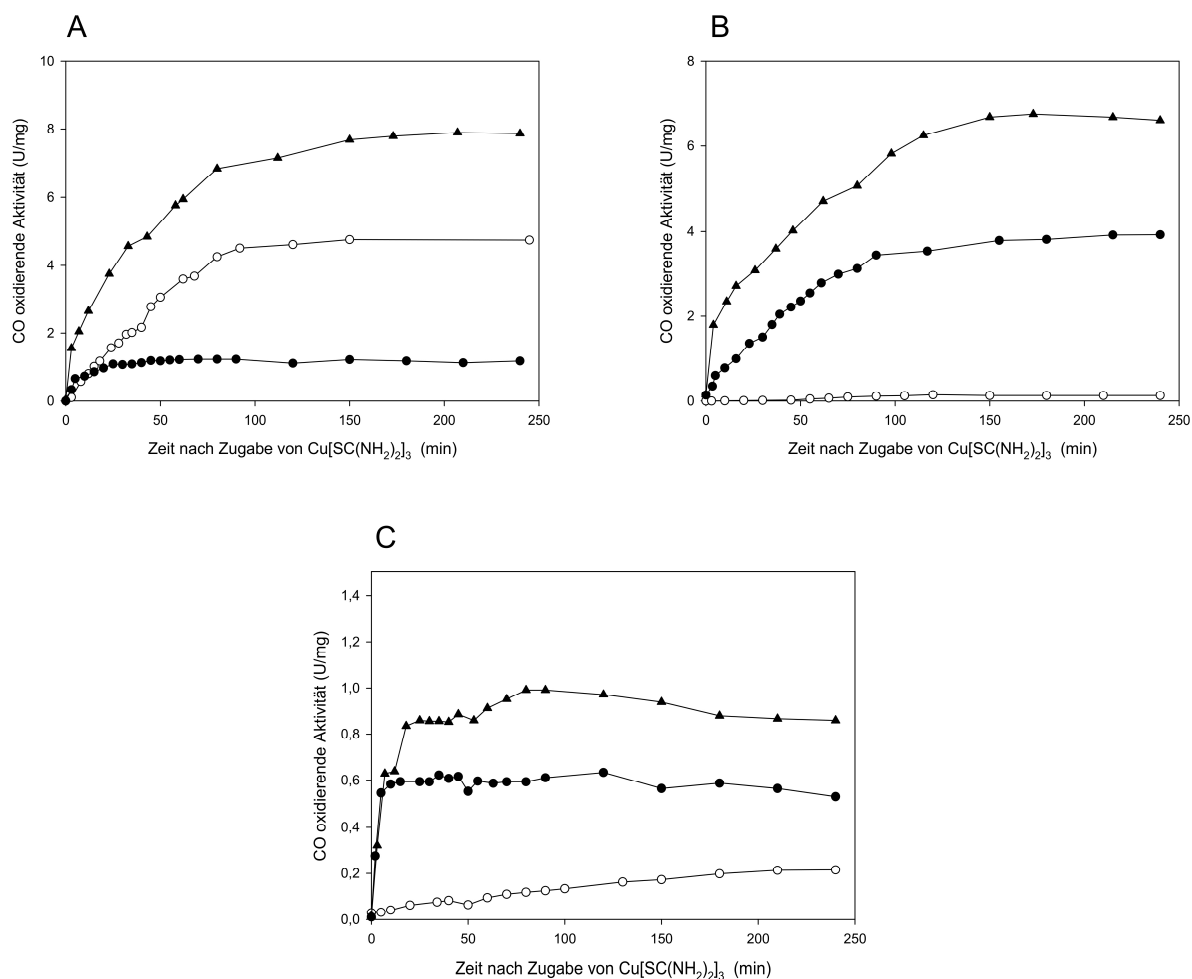


Abbildung 3-28: Funktionelle Rekonstitution des $[\text{CuSMoO}_2]$ -Clusters der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante in verschiedenen Puffersystemen.

Die Rekonstituierbarkeit der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante (jeweils 5 mg/ml) wurde in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ pH 7,2 (\circ), in 50 mM Tris/HCl pH 8,2 (\bullet) sowie in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 (\blacktriangle) analysiert. Nach Zugabe des $\text{Cu}[\text{SC}(\text{NH}_2)_2]_3\text{Cl}$ -Komplexes (125 μM) wurde der Anstieg der Aktivität verfolgt.

- (A) Vollständige Rekonstitution des Enzyms nach Inaktivierung durch 5 mM KCN. Im Anschluss wurde der $[\text{CuSMoO}_2]$ -Cluster mit Sulfid und Dithionit (jeweils 5 mM) sowie $\text{Cu}[\text{SC}(\text{NH}_2)_2]_3\text{Cl}$ (125 μM) wieder assembliert.
- (B) Aktivitätsverläufe nach anaerober Zugabe des Kupfer-Thioharnstoff-Komplexes unter vorheriger Sulfurierung mit Sulfid und Dithionit.
- (C) Anaerobe Kupfer-Rekonstitution des Enzym-Präparates mit 125 μM $\text{Cu}[\text{SC}(\text{NH}_2)_2]_3\text{Cl}$.

Tabelle 3-13: Aktivitäten der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 nach Rekonstitution in verschiedenen Puffersystemen.

CO-Dehydrogenase Präparate aus der *coxF*-Mutante wurden in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ pH 7,2, in 50 mM Tris/HCl pH 8,2 sowie in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 rekonstituiert und die Aktivitätssteigerungen nach Zugabe von 125 μM $\text{Cu}[\text{SC}(\text{NH}_2)_2]_3\text{Cl}$ verfolgt. Aufgeführt sind die End-Aktivitäten für die verschiedenen Rekonstitutionsansätze. Aktivitäten sind in U/mg angegeben.

Puffersystem	Rekonstitutionsansatz		
	KCN/S/Cu	S/Cu	Cu
50 mM HEPES/NaOH pH 7,2	7,89	6,75	1,12
50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ pH 7,2	4,76	0,14	0,22
50 mM Tris/HCl pH 8,2	1,22	3,93	0,63

Für alle drei Rekonstitutionsansätze konnte in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 die höchste Aktivität bzw. Aktivierung erreicht werden. Diese betrug nach KCN-Inaktivierung und dem stufenweisen Aufbau des aktiven Zentrums 7,89 U/mg. In 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ pH 7,2 betrug die maximal erreichte Aktivität nur 4,76 U/mg und somit nur 60,3 % des maximalen Wertes. Der Ansatz in 50 mM Tris/HCl pH 8,2 ließ sich nur auf 1,22 U/mg rekonstituieren. Durch die Behandlung mit KCN wird im aktiven Zentrum der CO-Dehydrogenase ein $[\text{MoO}_3]$ -Ion erzeugt (Resch et al. 2005). Wird auf diesen Schritt verzichtet, konnte durch die alleinige Sulfurierung mit Sulfid und Dithionit sowie die anschließende Zugabe des Kupfer-Thioharnstoff-Komplexes eine Aktivität von 6,75 U/mg in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 erreicht werden. In 50 mM Tris/HCl pH 8,2 wurden mit 3,93 U/mg noch 58,1 % dieser Aktivität erreicht, während in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ pH 7,2 nahezu keine Rekonstitution zustande kam. Die Aktivität betrug hier nach 250 min Inkubation mit $\text{Cu}[\text{SC}(\text{NH}_2)_2]_3\text{Cl}$ lediglich 0,14 U/mg.

Ein ähnliches Ergebnis ergab sich für die Cu(I)-Rekonstitution ohne vorherige Sulfurierung. Nach Zugabe des Kupfer-Thioharnstoff-Komplexes konnte das Präparat in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 auf eine Aktivität von 1,12 U/mg rekonstituiert werden. In 50 mM Tris/HCl pH 8,2 wurde dieser Wert nicht mehr erreicht. Hier kam es nur noch zu einer Aktivierung auf 0,63 U/mg, was 56,3 % der erlangten Aktivität in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 entspricht. Die Rekonstitution in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ pH 7,2 lieferte eine Aktivität von 0,22 U/mg und entsprach damit dem Wert der Aktivierung nach vorheriger Sulfurierung.

Entgegen den Ergebnissen von Resch (2004) konnte die höchste Aktivität bzw. Aktivierbarkeit nicht bei Verwendung von 50 mM Tris/HCl pH 8,2 sondern in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 erzielt werden. Dies könnte an der Tatsache liegen, dass in einem eher alkalischen Milieu die Bildung schwerlöslicher Metallhydroxide begünstigt wird und diese für eine Aktivierung der CO-Dehydrogenase nicht herangezogen werden können.

3.17 [2Fe-2S]-Zentren der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 und der Gehalt an säurelabilem Schwefel

UV/VIS-Absorptionsspektren konnten bisher zeigen, dass die redoxaktiven Kofaktoren, also FAD und die [2Fe-2S]-Cluster, in der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante funktionell sind. So ließ sich durch die Zugabe von 5 mM Na-Dithionit das Enzym reduzieren (Kap. 3.14). Zur weiteren Analyse der [2Fe-2S]-Zentren bzw. deren Redoxzustand wurden ESR-Spektren des Mutanten-Enzyms aufgenommen und mit in der Literatur vorhandenen ESR-Daten der wildtypischen CO-Dehydrogenase verglichen. Pelzmann et al. (2009) konnten bereits zeigen, dass sich die CO-Dehydrogenase aus der *coxD*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 in ähnlicher Weise mit Na-Dithionit reduziert lässt und auch hier die redoxaktiven Kofaktoren funktionell sind. ESR-Spektren dieses Mutanten-Enzyms lieferten unter Dithionit-reduzierenden Bedingungen bei 16 und 50 K typische rhombische Signale, welche sich nicht von denen des wildtypischen Enzyms unterschieden und charakteristisch für reduzierte [2Fe-2S]-Zentren waren. Unter CO-reduzierenden Bedingungen konnte kein Signal erhalten werden, woraus geschlossen wurde, dass sich die Mutation im Gen *coxD* auf das aktive Zentrum der CO-Dehydrogenase beschränkt, aber keinen Einfluss auf den intramolekularen Elektronentransport hat (Pelzmann et al. 2009).

Die CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante zeigte im luftoxidierten Zustand bei 16 und 50 K kein ESR-Signal (Abb. 3-29, Spur *a*). Das Enzym befand sich damit im diamagnetischen Zustand. Nach CO-Reduktion (Abb. 3-29, Spur *b*) konnte bei 16 und 50 K ebenfalls ein diamagnetisches Signal erhalten werden. Pelzmann et al. (2009) konnten demgegenüber zeigen, dass die CO-Dehydrogenase aus dem Wildtyp von *O. carboxidovorans* OM5 bei beiden Temperaturen charakteristische rhombische Signale zeigt – bei 16 K ein Signal, welches typisch für die reduzierten [2Fe-2S]-Zentren vom Typ I und Typ II ist, und bei 50 K ein Signal, welches charakteristisch für [2Fe-2S]-Zentren vom Typ I ist.

Wie bereits UV/VIS-Spektren (Kap. 3.14) zeigten, können in der CO-Dehydrogenase aus dem Mutantenstamm F::km keine Elektronen von CO auf die Eisen-Schwefel-Zentren übertragen werden, was einhergeht mit der nahezu nicht vorhandenen CO-oxidierenden Aktivität.

Unter Dithionit-reduzierenden Bedingungen konnten für die CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante sowohl bei 16 K als auch bei 50 K paramagnetische Signale erhalten werden. Die Signale entsprachen denen, wie sie von Gremer et al. (2000) für das Wildtyp-Enzym gemessen wurden. Hier lagen die g -Werte für das [2Fe-2S]-Zentrum vom Typ I (aufgenommen bei 50 K) bei $g_1 = 2,024$, $g_2 = 1,947$, $g_3 = 1,901$ und $g_{av} = 1,957$ (Gremer et al. 2000). Die entsprechenden g -Werte des Mutanten-Enzyms lagen unter gleichen Bedingungen bei $g_1 = 2,026$, $g_2 = 1,953$, $g_3 = 1,904$ und $g_{av} = 1,955$. Messungen bei 16 K liefern ein kombiniertes Signal, hervorgerufen durch beide [2Fe-2S]-Zentren. Für das [2Fe-2S]-Zentrum vom Typ I konnte für das Enzym aus der *coxF*-Mutante erneut ein rhombisches Signal erhalten werden mit $g_1 = 2,026$, $g_2 = 1,954$, $g_3 = 1,904$ und $g_{av} = 1,955$. Die Werte entsprechen denen, die von Gremer et al. (2000) bereits für das Wildtyp-Enzym ermittelt wurden, mit $g_1 = 2,025$, $g_2 = 1,947$, $g_3 = 1,900$ und $g_{av} = 1,957$. Für die Signal-Anteile des [2Fe-2S]-Zentrums vom Typ II konnte bei der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante ein g -Wert von $g_1 = 2,146$ ermittelt werden, welcher beim Wildtyp-Enzym zuvor zu $g_1 = 2,159$ bestimmt worden war (Gremer et al. 2000).

Wie beim Wildtyp und der inaktiven CO-Dehydrogenase aus der *coxD*-Mutante konnten somit für das Enzym aus der *coxF*-Mutante rhombische Signale unter Dithionit-reduzierenden Bedingungen erhalten werden. Diese für reduzierte [2Fe-2S]-Zentren charakteristischen Spektren unterschieden sich nicht von denen der *coxD*-Mutante und des Wildtyps. Daraus kann geschlossen werden, dass sich die Eisen-Schwefel-Cluster in einem redoxaktiven Zustand befinden und der intramolekulare Elektronentransport durch die Mutation im *coxF*-Gen nicht beeinträchtigt ist. Der ermittelte Gehalt an säurelabilem Schwefel (Kap. 3.13) mit $7,73 \pm 0,164$ mol pro mol Enzym ist mit diesen Beobachtungen in Einklang. Dass eine Reduktion mit CO nicht möglich ist, zeigt dagegen, dass die Mutation maßgeblichen Einfluss auf das aktive Zentrum hat.

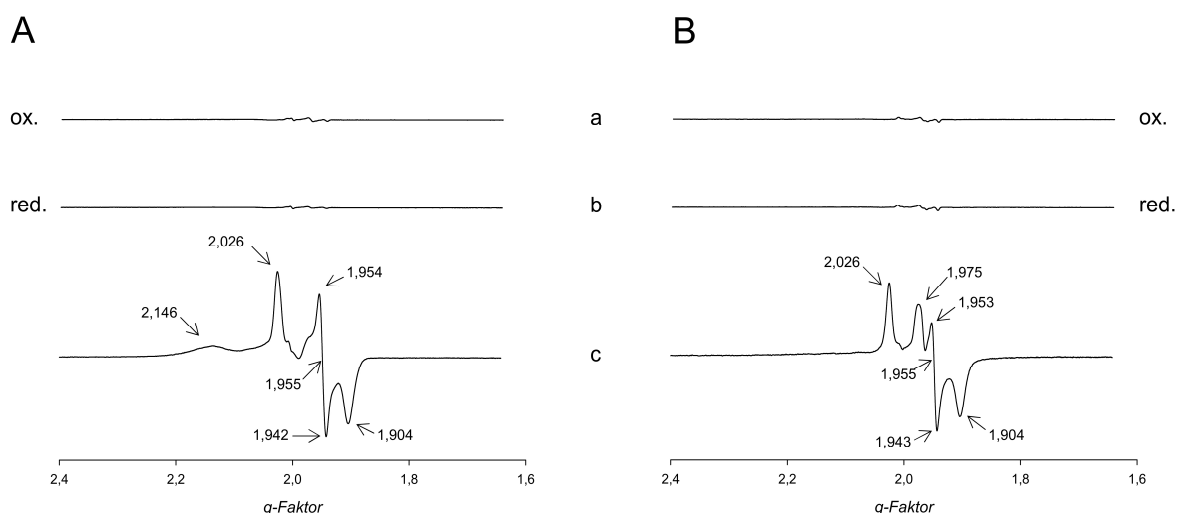


Abbildung 3-29: Analyse der [2Fe-2S]-Zentren der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 über Elektronspinresonanz-Spektroskopie (ESR).

Das Enzym (12 mg/ml in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2) wurde sowohl im luftoxidierten als auch im reduzierten Zustand (mit CO oder Dithionit) gemessen. Das Dithionit-reduzierte Präparat wurde mit 5 mM versetzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und ESR-spektroskopisch gemessen (Kap. 2.26.2). Das CO-reduzierte Präparat wurde vor dem Einfrieren unter anoxischen Bedingungen 30 min lang mit 100 % CO begast. Die Spektren wurden bei 16 K (A) bzw. 50 K (B) aufgenommen, die Mikrowellenfrequenz betrug 9,47 GHz bei einer Modulationsamplitude von 1 mT und einer Mikrowellenleistung von 10 mW. Spur *a*: luftoxidiertes Spektrum; Spur *b*: Spektrum CO-reduziert; Spur *c*: Spektrum DT-reduziert.

3.18 ESR-spektroskopische Analysen am Mo-Zentrum der CO-Dehydrogenase der Mutantenstämme F::km und G::km

Bisherige ESR-spektroskopische Messungen bei 16 und 50 K konnten zeigen, dass sich die CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 mit Dithionit, nicht jedoch mit CO reduzieren lässt. Im ersteren Fall ließ sich das Enzym „Ausbleichen“, es konnten rhombische ESR-Signale detektiert werden, die charakteristisch für die [2Fe-2S]-Zentren sind. Vergleichbare Signale konnten auch für das wildtypische Enzym erhalten werden (Gremer et al. 2000). In letzterem Fall, der Reduktion mit CO, trat kein paramagnetisches Signal auf. Aus beiden Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass die Kofaktoren der CO-Dehydrogenase der *coxF*-Mutante, also die Eisen-Schwefel-Zentren und das FAD, redoxaktiv sind und der intramolekulare Elektronentransport durch die Mutation im *coxF*-Gen nicht beeinträchtigt ist.

ESR-Spektren am Mo-Zentrum bei 120 K sollten Aufschluss darüber geben, inwieweit sich die Mutation auf das aktive Zentrum des Mutanten-Enzyms auswirkt. Des Weiteren sollten Spektren der CO-Dehydrogenase aus der *coxG*-Mutante aufgenommen werden, da dieses Enzym am Ende des posttranslationalen Reifungsprozesses einzuordnen ist, bereits CO-oxidierende Aktivität besitzt und der Vergleich mit dem Enzym der *coxF*-Mutante Rückschlüsse auf die Funktion des *coxF*-Genproduktes zulässt. Beide Mutanten-Enzyme stammten aus einem CO-induziert gewachsenen Organismus, so dass ein unter gleichen Bedingungen angezogener Wildtyp bzw. dessen CO-Dehydrogenase als Referenz diene.

Vom wildtypischen Enzym ist bekannt, dass das Mo durch zwei Dithiolenschwefel des MCD koordiniert wird. Des Weiteren besitzt das Mo zwei Sauerstoffliganden (apikal und äquatorial) sowie einen Sulfido-Liganden. Dieser μ -Brückenschwefel ist mit dem Cu(I) verbunden. Wird das Enzym mit Cyanid inaktiviert, so werden der Sulfido-Ligand und das Cu(I) abgespalten, ersterer wird durch Sauerstoff ersetzt (Dobbek et al. 2002). In ESR-Spektren ergibt sich für das aktive Enzym nach Dithionit-Behandlung ein komplexes Mo(V)-Signal, das Cyanid-inaktivierte Präparat zeigt ein einfaches rhombisches Mo(V)-*slow*-Signal (Meyer et al. 2000).

Durch ESR-spektroskopische Analysen der Enzyme aus der *coxF*- und der *coxG*-Mutante und deren Vergleich mit dem Wildtyp-Präparat sollten also Aussagen über den Aufbau des aktiven Zentrums möglich sein. Analysen des cyanolysierbaren Schwefels und des Kupfers zeigten bereits, dass gegenüber der *coxG*-Mutante und dem Wildtyp die *coxF*-Mutante Kupfer-defizient ist. In allen drei Präparaten konnte allerdings cyanolysierbarer Schwefel zu hohen Anteilen nachgewiesen werden. ESR-Spektren könnten somit Aufschluss darüber geben, ob in der *coxF*-Mutante ein Sulfido-Ligand am Mo vorhanden ist.

Spektren der *coxF*- und der *coxG*-Mutante sowie des Wildtyp-Enzyms wurden bei 120 K im luftoxidierten sowie im CO- und Dithionit-reduzierten Zustand aufgenommen. Zusätzlich wurden alle Präparate mit KCN-behandelt, um ein $[\text{MoO}_3]$ -Ion im aktiven Zentrum zu erzeugen (Dobbek et al. 2002; Resch et al. 2005; Pelzmann et al. 2009). Zur ESR-Messung wurden diese Präparate ebenfalls mit Dithionit behandelt. Im luftoxidierten Zustand konnten sowohl für das Präparat der *coxG*-Mutante als auch für das wildtypische Enzym keine ESR-Signale erhalten werden (Abb. 3-30, B und C, Spur a). Wie bereits von Gremer et al. (2000) beschrieben, befindet sich das Mo-Zentrum im Redox-Zustand Mo(VI) (Spin $S = 0$) und ist somit diamagnetisch. Für die CO-Dehydrogenase der *coxF*-Mutante konnte im luftoxidierten Zustand dagegen ein paramagnetisches Mo(V)-Signal mit den g -Werten $g_1 = 2,014$,

$g_2 = 1,978$, $g_3 = 1,965$, $g_4 = 1,951$, $g_5 = 1,945$ und $g_{av} = 1,975$ erhalten werden (Abb. 3-30, A, Spur a). Über Spin-Integration auf Basis eines Cu(II)-EDTA-Standards konnte der Mo(V)-Anteil zu 16 % des Gesamtanteils an Molybdän bestimmt werden. Ein nahezu identisches ESR-Spektrum (Spin-Integral 18 %) zeigte sich auch nach CO-Reduktion (Abb. 3-30, A, Spur b). Dennoch unterschied sich dieses Signal stark von den komplexen Spektren der katalytisch aktiven Präparate der *coxG*-Mutante und des Wildtyp-Enzyms nach CO-Reduktion (Abb. 3-30, B und C, Spur b). Dies ist in Einklang mit den aufgenommenen UV/VIS-Spektren, die ebenfalls zeigten, dass die CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante nicht mit CO reduziert werden kann. Jedoch war eine Reduktion mit Dithionit möglich, was sich auch in den ESR-Spektren widerspiegelte: Nach Dithionit-Behandlung kann für das Präparat der *coxF*-Mutante ein rhombisches Mo(V)-*slow*-Signal erhalten werden (Abb. 3-30, A, Spur d). Dieses Signal mit den g -Werten $g_1 = 1,978$, $g_2 = 1,974$, $g_3 = 1,963$, $g_4 = 1,954$ und $g_{av} = 1,968$ entspricht dem Signal einer inaktiven Desulfo-Form des Wildtyps (Meyer et al. 2000) sowie eines KCN-behandelten Wildtyp-Enzyms nach Sulfurierung mit Sulfid unter Dithionit-reduzierenden Bedingungen. Das Wildtyp-Enzym als auch die CO-Dehydrogenase aus der *coxG*-Mutante zeigen nach Dithionit-Reduzierung komplexe Mo(V)-Signale (Abb. 3-30, B und C, Spur d). Nach Behandlung mit KCN und nachfolgender Dithionit-Behandlung kann für alle drei Enzym-Präparate ein Mo(V)-*slow* Signal (Abb. 3-30, A - C, Spur c) und somit ein charakteristisches Desulfo-Signal erhalten werden. Die KCN-Behandlung führt zur Ausbildung eines $[\text{MoO}_3]$ -Ions im aktiven Zentrum von CO-Dehydrogenase. Der Vergleich der Wildtyp-Spektren nach Dithionit-Behandlung (Abb. 3-30, C, Spur d) sowie nach KCN- und Dithionit-Behandlung (Abb. 3-30, C, Spur c) zeigt, dass ein gewisser Anteil des Enzyms im *as isolated* Zustand bereits als $[\text{MoO}_3]$ vorliegen muss. Sowohl ohne vorherige als auch mit vorheriger KCN-Behandlung können Peaks mit den g -Werten $g_1 = 1,979$, $g_2 = 1,974$, $g_3 = 1,963$, $g_4 = 1,955$ detektiert werden. Diese Signal-Anteile sind im komplexen Mo(V)-Signal der *coxG*-Mutante nach Dithionit-Reduktion nahezu nicht vorhanden (Abb. 3-30, B, Spur d). Für die *coxF*-Mutante kann nach Dithionit-Behandlung (mit und ohne vorherige KCN-Inaktivierung) ein Mo(V)-*slow* Signal detektiert werden (Abb. 3-30, A, Spur c bzw. d), welches ebenfalls mit dem Signal eines KCN-behandelten und nachfolgend sulfurierten Wildtyp-Präparates nach Dithionit-Reduzierung übereinstimmt (Resch et al. 2005). Die ESR-Messung lässt folglich verschiedene Möglichkeiten für die Struktur des aktiven Zentrums zu: So könnte der cyanolysierbare Schwefel in der *coxF*-Mutante als auch im KCN-behandelten und sulfurierten Wildtyp-Enzym als Molybdän-Schwefel bzw. Sulfido-Ligand des Molybdäns vorliegen, oder in Form einer Persulfids am Cystein³⁸⁸.

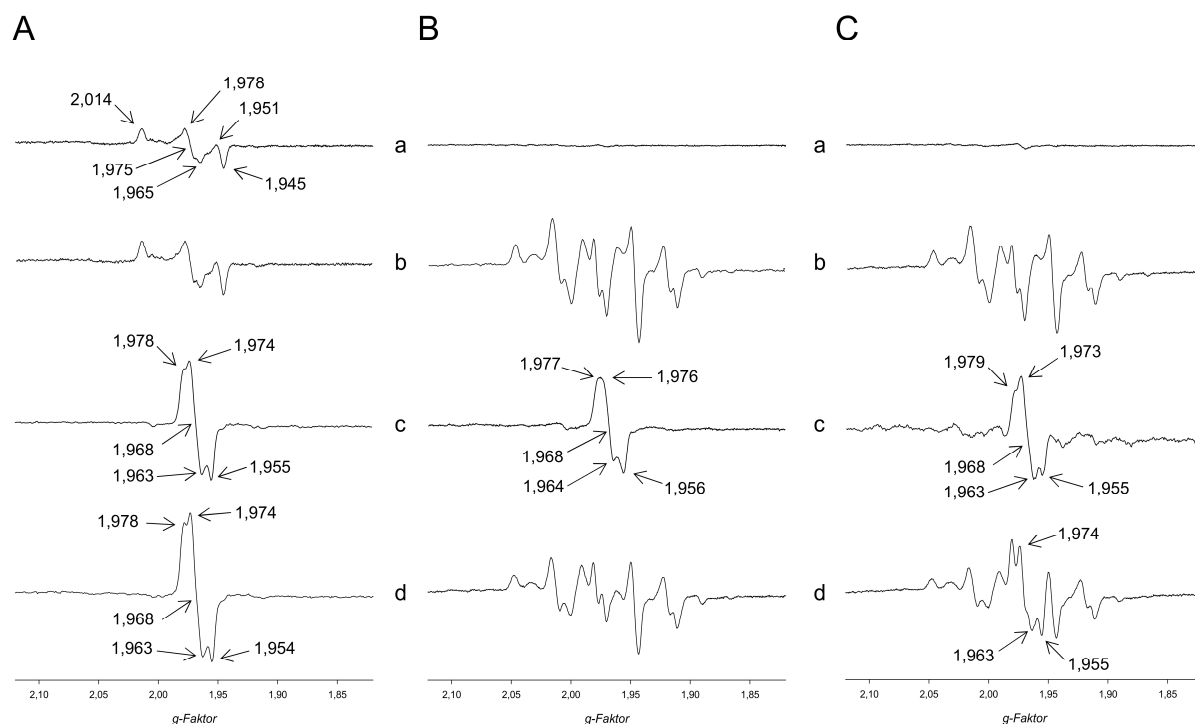


Abbildung 3-30: Untersuchung des Mo-Zentrums der CO-Dehydrogenasen aus dem Wildtyp und den Insertionsmutanten in *coxF* und *coxG* (jeweils CO-induziert gewachsen) mittels ESR.

ESR-Spektren der CO-Dehydrogenasen der *coxF*-Mutante (A), der *coxG*-Mutante (B) sowie des CO-induziert gewachsenen Wildtyps (C) von *O. carboxidovorans* OM5 wurden in luftoxidiertem (Spur a) und reduziertem (Spuren b - d) Zustand aufgenommen. Die Konzentration betrug jeweils 12 mg/ml in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2. CO-reduzierte Proben wurden unter anoxischen Bedingungen 30 min mit 100 % CO begast, Dithionit-reduzierte Proben wurden mit 5 mM Na-Dithionit behandelt. Cyanid-behandelte Ansätze wurden unter anoxischen Bedingungen mit 5 mM KCN inkubiert. Nach 16 h wurde der Cyanid-Überschuss mittels Gelfiltration abgetrennt und das Enzym mit 5 mM Na-Dithionit inkubiert. Alle Proben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Messung bei -80 °C gelagert. Die Aufnahme der Spektren erfolgte bei 120 K bei einer Mikrowellenfrequenz 9,47 GHz, einer Modulationsamplitude von 1 mT und einer Mikrowellenleistung von 10 mW.

Spektren a: luftoxidiert; Spektren b: CO-reduziert; Spektren c: CN⁻ inaktiviert und DT-reduziert; Spektren d: DT-reduziert.

3.19 Kristallisation der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5: Verlust des cyanolysierbaren Schwefels

Zur Aufklärung der Struktur des aktiven Zentrums wurde die CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 kristallisiert. Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass das aktive Zentrum Kupfer-defizient ist, aber zu 70 % cyanolysierbaren Schwefel (verglichen mit einem vollbesetzten Wildtyp-Enzym) besitzt. Hier stellte sich v.a. die Frage, an welcher „Position“ dieser Schwefel zu finden ist. Dabei wäre eine Möglichkeit, dass der Schwefel als Sulfido-Ligand am Molybdän gebunden ist, oder aber in Form eines Persulfids am Cystein³⁸⁸ vorliegt (Abb. 3-31). Anhand verschiedener Rekonstitutionsexperimente (Kap. 3.15) kann desweiteren in Betracht gezogen werden, dass sich das Präparat der *coxF*-Mutante aus verschiedenen CO-Dehydrogenase-Spezies zusammensetzt. So könnte ein Anteil als [MoO₃]-Ion vorliegen, wie es im Cyanid-behandelten Enzym oder in der *coxD*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 der Fall ist (Pelzmann et al. 2009). Der andere Anteil könnte sich als Gemisch darstellen, mit Spezies die einen Schwefel (am Molybdän oder als Persulfid am Cystein³⁸⁸) im aktiven Zentrum haben oder z.B. in Form eines persulfidischen Mo-S-SH sogar zwei Schwefel aufweisen (Abb. 3-31).

Die Frage nach der Position des Schwefels war v.a. auch in Zusammenhang mit dem von Resch et al. (2005) postulierten Mechanismus der chemischen Rekonstitution von CO-Dehydrogenase von Interesse. Der hier vorgeschlagene Mechanismus beruht darauf, dass nach Cyanid-Behandlung zunächst ein [MoO₃]-Ion im aktiven Zentrum entsteht, welches dann durch Inkubation mit Sulfid unter Dithionit-reduzierenden Bedingungen zu einem [MoO₂S] sulfuriert wird. Wie diese Spezies besitzt auch die CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante cyanolysierbaren Schwefel, allerdings müssen sich beide Enzyme in Bezug auf den vorkommenden Schwefel unterscheiden: Das resulfurierte [MoO₂S]-Enzym lässt sich durch Zugabe eines Cu[SC(NH₂)₂]₃Cl-Komplexes zu einem aktiven Enzym rekonstituieren, während beim Mutanten-Enzym nur 14,2 % dieser Aktivität wiedergewonnen werden können.

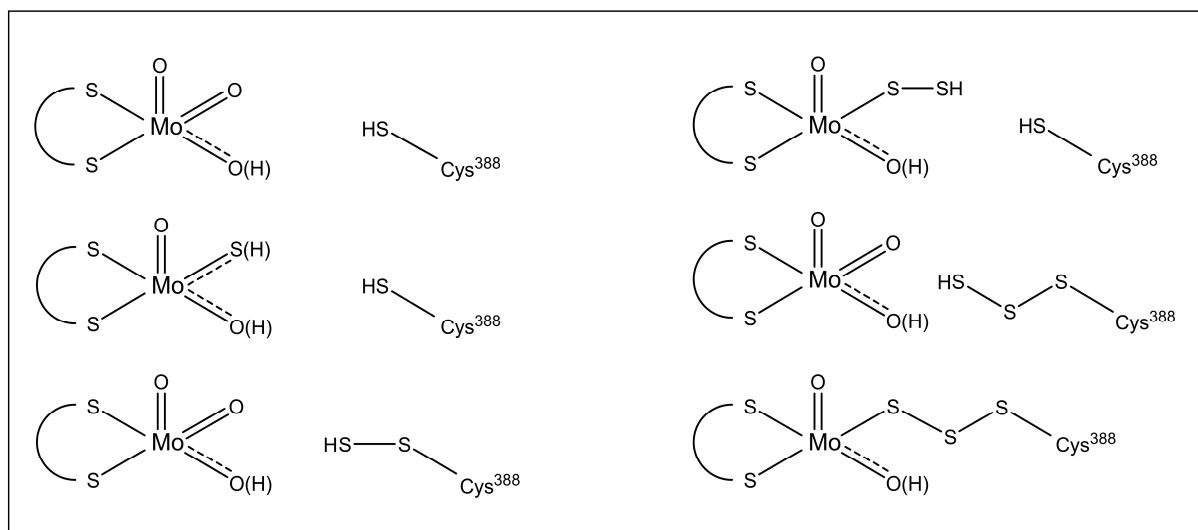


Abbildung 3-31: Hypothetische Strukturen des aktiven Zentrums der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante.

Die möglichen Strukturen ergeben sich aus der Bestimmung des cyanolysierbaren Schwefels mit 1,40 mol pro mol Protein, aus den Kupferanalysen mit 0,045 mol pro mol Protein (Kap. 3.13) als auch aus den verschiedenen Rekonstitutionsexperimenten (Kap. 3.16). Letztere ließen vermuten, dass es sich bei dem Enzym-Präparat um keine einheitliche Spezies handelt, sondern dass ein Gemisch mit verschiedenen aktiven Zentren vorliegt. Dies reicht von einem $[\text{MoO}_3]$ -Ion bzw. einem $[\text{MoO}_2\text{S}]$ -Ion bis hin zu persulfidischen Strukturen am Cystein³⁸⁸ oder am Mo-Zentrum. Auch ein Trisulfid kommt aufgrund der schlechten Rekonstituierbarkeit mit Cu(I) in Betracht.

Die Kristallisation der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante erfolgte im Dampfdiffusionsverfahren nach Ducruix und Giege (1992) im „hängenden Tropfen“. Hierbei wurden die bereits von Dobbek et al. (1999) beschriebenen Bedingungen gewählt, durch welche die Löslichkeitsgrenze des Proteins schließlich überschritten wird und Proteinkristalle entstehen. Nach 7 - 10 Tagen konnten Kristalle mit einer Größe von 0,1 bis 0,2 mm geerntet werden (Abb. 3-32).

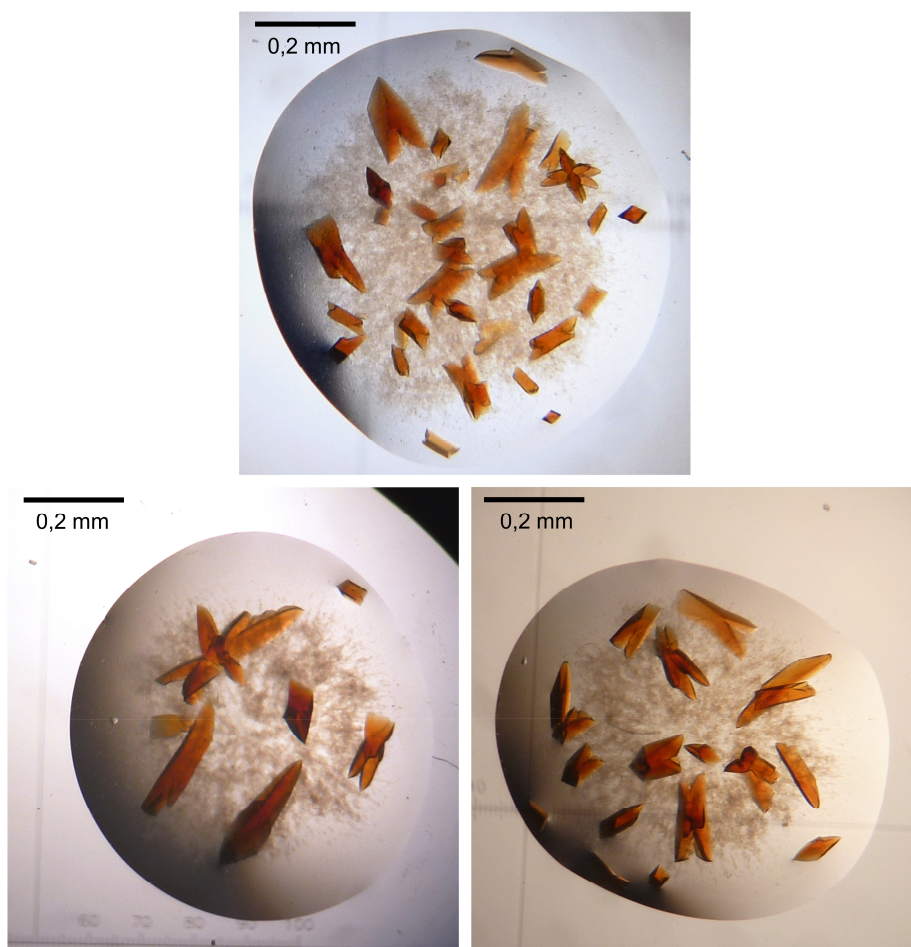


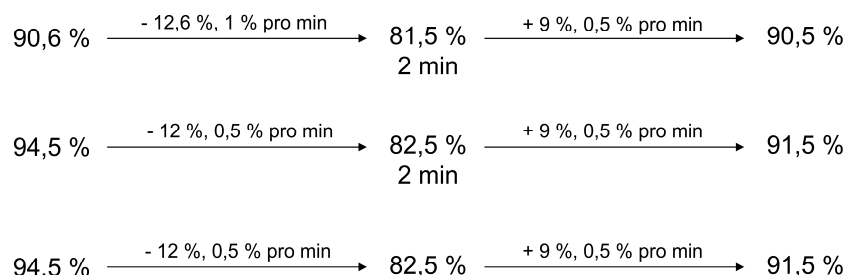
Abbildung 3-32: Proteinkristalle der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5.

Kristalle der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 wurden im Dampfdiffusionsverfahren nach der *hanging drop* Methode erhalten (Kap. 2.30). Hierzu wurden 6 - 8 μ l Proteinlösung (18 - 30 mg/ml in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2) mit jeweils 2,6 - 3,2 μ l Kristallisationslösung (0,8 M KH_2PO_4 /KOH pH 7,5; 0,8 M NaH_2PO_4 /NaOH pH 7,5; 80 mM HEPES/NaOH pH 7,5; 3 % MPD) versetzt und gegen 700 μ l Kristallisationslösung äquilibriert. Die Anzucht der Kristalle erfolgte bei 4 °C, Kristalle konnten nach 7 - 10 Tagen geerntet werden.

Die Aufklärung der Struktur der CO-Dehydrogenase aus der *coxE*-Mutante sollte in analoger Weise erfolgen (Dr. A. Pelzmann, persönliche Mitteilung). Hierfür wurden Kristalle unter gleichen Bedingungen gezüchtet. Proteinkristalle beider Mutanten wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. H. Schindelin und Dr. J. Kuper am Rudolf-Virchow-Zentrum für Experimentelle Biomedizin, Universität Würzburg) transformiert, um die Diffraktion zu verbessern. In einem Gasstrom wird dabei die Anfangsfeuchtigkeit der Kristalle zunächst in einem Gradienten

reduziert, für eine gewisse Zeitspanne bei einem konstanten Wert gehalten, und danach wieder erhöht. Verschiedene Protokolle wurden angewendet:

Anfangs-
feuchtigkeit



Die für die Transformation herangezogenen Kristalle hatten überwiegend eine kompakte, kubische Form, mit Auflösungen von 2,5 - 2,6 Å im nativen Zustand. Im Zuge der Transformation konnte diese Auflösung auf 2,3 Å verbessert werden. Zudem war eine erhebliche Verbesserung der Mosaizität zu beobachten. Nach Transformation wurden die jeweils auf einem loop fixierten Kristalle zur Bestimmung der Röntgenstruktur schockgefroren. Datensätze sollten mit Synchrotron-Strahlung am European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, Frankreich) aufgenommen werden. Im Zuge des Einfrierprozesses verschlechterte sich die Auflösung der Kristalle der *coxF*-Mutante allerdings so erheblich, dass eine Röntgenstruktur nicht erstellt werden konnte. Lediglich für die Proteinkristalle der *coxE*-Mutante konnte eine Röntgenstruktur mit 1,9 Å Auflösung erstellt werden (Dr. A. Pelzmann, persönliche Mitteilung). Die Auswertung der Daten erfolgte erneut durch Prof. Dr. H. Schindelin, Universität Würzburg.

In der *coxE*-Mutante konnten wie bei der *coxF*-Mutante signifikante Mengen an cyanolysierbarem Schwefel gemessen werden (Dr. A. Pelzmann, persönliche Mitteilung). Darüber hinaus lag der Gehalt an cyanolysierbarem Schwefel mit $2,0 \pm 0,02$ mol pro mol Enzym noch höher als im Enzym der *coxF*-Mutante. Die Struktur der CO-Dehydrogenase aus der *coxE*-Mutante zeigte entgegen den Erwartungen jedoch ein [MoO₃]-Ion im aktiven Zentrum, wie es auch für das Enzym der *coxD*-Mutante gezeigt werden konnte (Pelzmann 2008), und ein Cystein³⁸⁸ mit einem nicht-modifizierten γ-Schwefel. Weder am Molybdän (als Sulfido-Ligand) noch am Cystein³⁸⁸ (als Persulfid) konnte Schwefel nachgewiesen werden. Analysen des cyanolysierbaren Schwefels in aufgelösten Proteinkristallen zeigten schließlich, dass der cyanolysierbare Schwefel schon vor der

Transformation der Kristalle nicht mehr vorhanden war (Dr. A. Pelzmann, persönliche Mitteilung).

Um zu überprüfen, ob der cyanolysierbare Schwefel der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante im Rahmen der Kristallisation im aktiven Zentrum des Enzyms erhalten bleibt, wurden entsprechende Kristalle in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 aufgelöst und zunächst mehrfach „gewaschen“, um Reste der Kristallisationslösung zu entfernen. Dies erfolgte mittels Ultrafiltration in Vivaspin 500 - Konzentratoren (Sartorius, Göttingen, Deutschland) an einer PES-Membran mit 30 kDa Ausschlussgrenze. Die Bestimmung des cyanolysierbaren Schwefels zeigte, dass letzterer in der *coxF*-Mutante ebenfalls nicht stabil ist und im Zuge der Kristallisation nicht im aktiven Zentrum gebunden bleibt. Der Schwefelgehalt betrug nur noch $0,207 \pm 0,089$ mol Schwefel pro mol Enzym. Die CO-oxidierende Aktivität sank ebenfalls von 0,136 auf 0,019 U/mg. Die Ursache für den Verlust des cyanolysierbaren Schwefels könnten Oxidationsprozesse sein. So könnte der cyanolysierbare Schwefel durch entstehende Hydroxylradikale in Form von H_2S abgespalten werden. Das Ergebnis wäre ein $[\text{MoO}_3]$ -Ion wie nach Inaktivierung von CO-Dehydrogenase-Präparaten durch Cyanid-Behandlung.

3.20 Alkylierungsexperimente zur Strukturaufklärung: Einfluss von Alkylierungsmitteln auf die Aktivität und Rekonstituierbarkeit der CO-Dehydrogenase

Die bisherigen Analysen der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 zeigten, dass das Enzym auf dem Niveau eines durch Cyanid inaktivierten und nachfolgend resulfurierten Wildtyp-Präparates steht. Beide Enzym-Spezies, sowohl das Präparat aus der *coxF*-Mutante, als auch die resulfurierte CO-Dehydrogenase des Wildtyps zeigen im Mo-ESR bei 120 K ein Mo(V)-*slow* Signal, welches ununterscheidbar ist vom ESR-Spektrum einer $[\text{MoO}_3]$ - *active site* (Kap. 3.18 bzw. Resch et al. 2005). Die ESR-Spektren lieferten somit auch keinen eindeutigen Beweis für die Position des Schwefels in diesen beiden schwefelhaltigen Enzym-Spezies. Resch et al. (2005) postulierten für die chemische Rekonstitution einen Mechanismus, bei dem durch Cyanid-Zugabe zunächst ein $[\text{MoO}_3]$ -Ion im aktiven Zentrum erzeugt wird. Im Anschluss kann durch Inkubation mit Sulfid unter Dithionit-reduzierten Bedingungen ein $[\text{MoO}_2\text{S}]$ gebildet werden. Der Schwefel kann am Molybdän dabei im Verhältnis 1 : 1 an zwei verschiedene äquatoriale Positionen binden, die allerdings nicht äquivalent sind. Nur in einem Fall kann nach Cu(I)-Zugabe ein

funktionelles Enzym erhalten werden. Im anderen Fall wird der Schwefel im Rahmen der Cu(I)-Zugabe als Cu_2S wieder freigesetzt.

Da sich die Position des Schwefels bisher nicht eindeutig nachweisen ließ, wäre als weiteres Modell denkbar, dass sich die Rekonstitution nicht am Molybdän, sondern am Cystein³⁸⁸ vollzieht (Abb. 3-33). Ein Präparat von CO-Dehydrogenase würde hier nach Behandlung mit Cyanid auch zunächst ein $[\text{MoO}_3]$ -Ion im aktiven Zentrum aufweisen. Der nachfolgende Sulfurierungsschritt würde dann nicht eine der beiden äquatorialen Oxo-Gruppen am Molybdän ersetzen, sondern zur Bildung eines Persulfids am Cystein³⁸⁸ führen. Die Zugabe des Cu(I)-Thioharnstoff-Komplexes führt zur Bindung des Kupfers an diesem Persulfid, der persulfische Schwefel behält seinen sulfidischen Charakter. Durch Umlagerung wird ein Sulfan-Schwefel gebildet, welcher eine Bindung zum Molybdän ausbildet, unter Abspaltung einer Oxo-Gruppe als H_2O . Der $[\text{CuSMoO}_2]$ -Cluster würde im Rahmen der Ausbildung der Bindung zwischen Molybdän und Schwefel entstehen (Abb. 3-33).

Nach bisherigen Analysen ist der nach Sulfurierung „eingebaute“ Schwefel im aktiven Zentrum cyanolysierbar. Flavin (1962), Wood (1987) und De Beus et al. (2004) konnten zeigen, dass persulfidischer Schwefel ebenso diese Eigenschaft besitzt und mit Cyanid als SCN^- freigesetzt werden kann. Zudem war es im Versuch möglich, reduziertes Glutathion mit Sulfid unter Dithionit-reduzierten Bedingungen zu sulfurieren und den persulfidischen Schwefel mit Cyanid als Thiocyanat freizusetzen (nicht gezeigt).

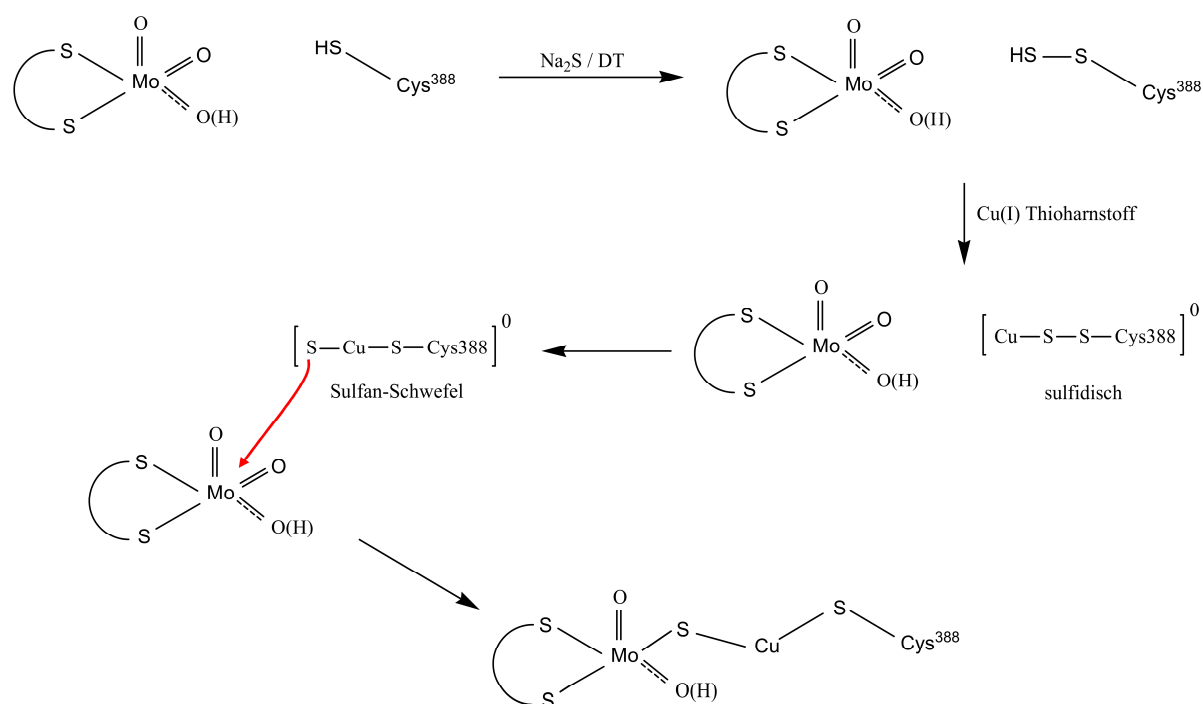


Abbildung 3-33: Möglicher Mechanismus der chemischen Rekonstitution von CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* OM5 unter der Annahme der Bildung eines Persulfids am Cystein³⁸⁸.

Das Modell der Rekonstitution unter Annahme eines persulfidischen Schwefels am Cystein³⁸⁸ geht davon aus, dass bei der Sulfurierung des [MoO₃]-Zentrums mit Sulfid/Dithionit (vgl. Kap. 2.29.2) nicht das eigentliche [MoO₃]-Ion, sondern der γ-Schwefel des Cystein³⁸⁸ sulfuriert wird. Im Zuge dieser Reaktion entsteht ein Cystein-Persulfid. Bei der nachfolgenden Behandlung mit dem Cu[SC(NH₂)₂]₃Cl Komplex bindet Cu an den persulfidischen Schwefel. Eine anschließende Umlagerung würde den sulfidischen Schwefel schließlich auf das Niveau eines Sulfan-Schwefels bringen, welcher dann eine Reaktion mit dem Mo eingehen könnte. Eine äquatoriale Oxogruppe des Mo würde als H₂O abgespalten und eine Bindung zwischen Mo und S ausgebildet werden. Auf diese Weise könnte sich die Assemblierung des [CuSMoO₂]-Clusters im Rahmen der chemischen Rekonstitution vollziehen.

Die CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 kann als eine Biosynthese-Vorstufe im Rahmen der Assemblierung des aktiven Zentrums angesehen werden. Die Tatsache, dass sich dieses Präparat im Gegensatz zu einem Cyanid-behandelten und anschließend sulfurierten Wildtyp-Präparat nur verhältnismäßig schwach mit Cu(I) rekonstituieren lässt, wirft die Frage auf, ob die chemische Rekonstitution und die Assemblierung des aktiven Zentrums *in vivo* eventuell unterschiedlichen Mechanismen folgen und der cyanolysierbare Schwefel im Präparat der *coxF*-Mutante an einer anderen Position gebunden ist als es im Cyanid-behandelten, sulfurierten Wildtyp-Präparat der Fall ist.

Von einer Reihe von Alkylierungsmitteln ist bekannt, dass sie spezifisch an den γ -Schwefel von Cysteinen binden. *N*-Ethylmaleimid (NEM) und Iodacetamid (IAA) können hier genannt werden. Tomblin et al. (2013) untersuchten beispielweise das Protein PA1006 aus *Pseudomonas aeruginosa*. Dieses besitzt u.a. das nicht-konservierte Cystein¹¹ sowie einen hoch-konservierten Cystein-Rest, Cystein²², welches im Rahmen von Interaktionen mit Cystein-Desulfurasen zum Persulfid Cys²²-S-SH modifiziert werden kann. Die Autoren konnten zeigen, dass NEM in der Lage ist, sowohl das Cys¹¹-SH als auch das Cys²²-S-SH zu alkylieren. Die Bindung von NEM oder IAA an R-SH oder R-S-SH wurde auch von Pan und Carrol (2013) nachgewiesen. Glutathion-Disulfide (GSSG) wurden mit Na₂S inkubiert, was zu einem Gemisch aus GSH und GSSH führte. Beide Formen konnten mit NEM und IAA alkyliert und die Reaktionsprodukte mittels LC-MS nachgewiesen werden.

NEM besitzt eine polare Oberfläche von 37,4 Å² und hat eine molekulare Masse von 125,10 g/mol, IAA eine polare Oberfläche von 43,1 Å² und eine molekulare Masse von 185 g/mol. Beide Moleküle sollten aufgrund dieser Eigenschaften in der Lage sein, den Substratkanal der CO-Dehydrogenase mit einem Durchmesser von 7 Å (Dobbek et al. 1999) zu passieren und zum aktiven Zentrum vordringen zu können. In diesem Fall könnte der γ -Schwefel des Cystein³⁸⁸ oder aber ein mögliches Cystein³⁸⁸ - Persulfid alkyliert werden, was sich in der (fehlenden bzw. beeinträchtigten) Rekonstituierbarkeit entsprechender Enzym-Präparate zeigen sollte. Um die Bindung eines derartigen Alkylierungsmittels im aktiven Zentrum nachweisen zu können, wurde ¹⁴C-Iodacetamid eingesetzt. Die entsprechenden Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. A. Pelzmann (Lehrstuhl Mikrobiologie, Universität Bayreuth) durchgeführt. ¹⁴C-IAA wurde zu verschiedenen Präparaten von CO-Dehydrogenase (Wildtyp und Mutanten) hinzugegeben und die Enzym-Lösung 1 h lang unter Ausschluss von Licht bei Raumtemperatur inkubiert (Kap. 2.31 und 2.32). Um die Bedingungen für eine Alkylierungsreaktion zu optimieren, wurden die Enzym-Präparate vor der Inkubation in einen alkalischen Puffer mit pH 8,5 umgepuffert, da bei diesem pH-Wert Sulfhydrylgruppen deprotoniert als R-S⁻ vorliegen. Zudem wurden vor der Inkubation anoxische Bedingungen geschaffen.

Mittels Ammoniumsulfat-Präzipitation wurde das Enzym nach der Inkubationszeit schließlich gefällt, so dass nicht-gebundenes ¹⁴C-IAA abgetrennt werden konnte (Kap. 2.32). Die Anzahl an notwendigen Waschschritten wurde im Vorfeld ermittelt (Abb. 3-34). Hierzu wurde CO-Dehydrogenase (500 µl mit 3 mg/ml) aus dem Wildtyp von *O. carboxidovorans* OM5 mit ¹⁴C-IAA (400.000 dpm) 1 h inkubiert, das Protein schließlich mit Ammoniumsulfat ausgefällt und vierfach gewaschen. Im Anschluss wurde das Protein

erneut in Puffer aufgenommen. Vom ersten Überstand (ÜS) als auch von den Waschfraktionen (WF1-4) und dem resuspendierten Protein (CO-DH) wurden jeweils 200 µl in Messröhrchen mit Szintillationscocktail überführt und im Szintillationszähler gemessen (10-fach Bestimmung). Die erhaltenen Mittelwerte wurden auf das Gesamtvolumen der jeweiligen Fraktionen hochgerechnet und einander gegenüber gestellt (Abb. 3-34). Dabei zeigte sich, dass bereits nach zwei Waschschritten nahezu keine Radioaktivität mehr in den Waschfraktionen detektiert wurde. Die verbleibende Radioaktivität konnte in der resuspendierten Proteinprobe gemessen werden, was auf eine Bindung des ^{14}C -IAA an die CO-Dehydrogenase hinweist. Darüber hinaus konnte sämtliche eingesetzte Radioaktivität in Überstand, Waschfraktionen und resuspendierter Proteinprobe wiedergefunden werden.

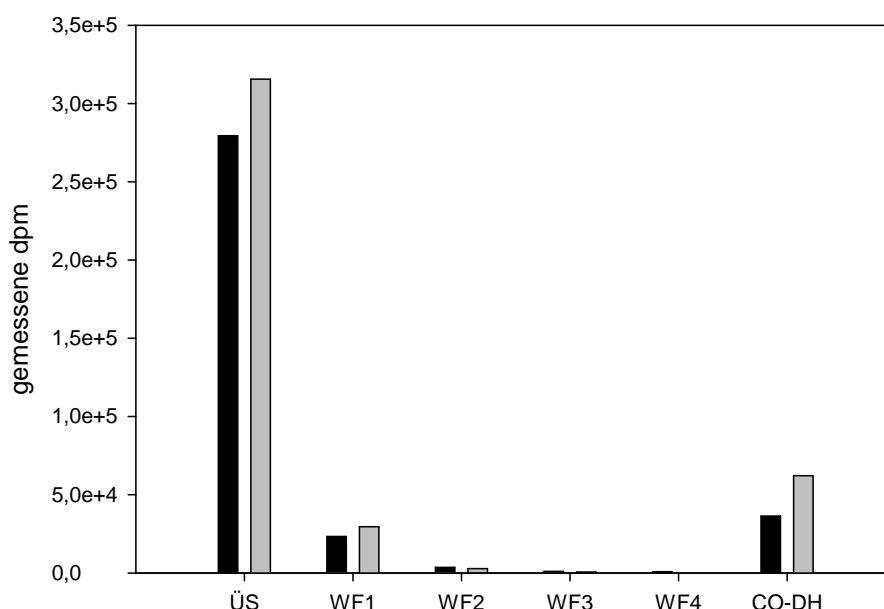


Abbildung 3-34: Ermittlung der Anzahl notwendiger Waschschrritte mittels Ammoniumsulfatfällung nach Inkubation von CO-Dehydrogenase mit ^{14}C -IAA.

CO-Dehydrogenase (2 Ansätze, 500 µl mit 3 mg/ml in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ pH 8,5) wurde mit ^{14}C -IAA (400.000 dpm) wie unter Kap. 2.32 beschrieben, inkubiert. Anschließend wurde der Proteinanteil durch Zugabe von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ausgefällt und durch niedertourige Zentrifugation pelletiert. Der Überstand (ÜS) wurde abgenommen und das Pellet in $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ pH 8,5 gelöst. Im Anschluss wurde das Protein erneut mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ausgefällt, abzentrifugiert und wieder in Puffer gelöst. Insgesamt wurden vier Waschschrritte durchgeführt (WF1-4). 200 µl von Überstand (ÜS), den Waschfraktionen (WF1-4) und des resuspendierten Proteinpellets (CO-DH) wurden schließlich in Messröhrchen mit 10 ml Szintillationscocktail überführt und durch vorsichtiges Schwenken gelöst. Die Messung im Szintillationszähler erfolgte als 10-fach-Bestimmung. Die resultierenden Mittelwerte wurden anschließend auf das Gesamtvolumen der jeweiligen Fraktion hochgerechnet und als Balkendiagramm aufgetragen.

Eine Abtrennung von überschüssigem ^{14}C -IAA mittels Ultrafiltration (Vivaspin 500; Sartorius, Göttingen, Deutschland) stellte sich als nicht sinnvoll heraus, da ein Teil der CO-Dehydrogenase-Fraktion an der PES-Membran präzipitierte und nicht mehr gelöst werden konnte – was zu unkalkulierbaren Abweichungen in der Proteinkonzentration führte.

Die Markierungen mit ^{14}C -IAA wurden zunächst mit aktiven CO-Dehydrogenase-Präparaten des Wildtyp und der *coxG*-Mutante durchgeführt (Abb. 3-35, \circ bzw. \square). Letztere wurde freundlicherweise von Frau B. Melzer zur Verfügung gestellt. Die Analyse des Gehalts an cyanolysierbarem Schwefel und Cu(I) ergab 1,87 mol S und 1,91 mol Cu pro mol Enzym für das Wildtyp-Präparat sowie 1,96 mol S und 1,67 mol Cu pro mol Enzym für das hier eingesetzte Präparat der *coxG*-Mutante. Die CO-oxidierenden Aktivitäten betrugen 2,91 U/mg (Wildtyp) bzw. 2,28 U/mg (*coxG*-Mutante). In beiden Fällen handelt es sich (trotz der geringen CO-oxidierenden Aktivitäten) also um CO-Dehydrogenasen mit nahezu vollständig assemblierten aktiven Zentren. Die Inkubation mit ^{14}C -IAA sollte in erster Linie darauf abzielen, den γ -Schwefel oder im Falle von vorliegenden Biosynthese-Vorstufen einen möglichen persulfidischen Schwefel am Cystein³⁸⁸ zu markieren. Um eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit zu untersuchen, wurden die Präparate mit IAA-Endkonzentrationen von 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10 und 12,5 mM inkubiert. Jeder Konzentrationsstufe waren im Vorfeld 400.000 dpm ^{14}C -IAA zugesetzt worden. Für beide Präparate zeigten sich dabei biphasische Kurvenverläufe (vgl. Abb. 3-35, \circ bzw. \square). Nach einem schnellen Anstieg des Gehaltes an gebundenem ^{14}C -IAA (bis ca. 1 mM Endkonzentration) geht das System in eine zweite Phase über. Hier ist zudem erkennbar, dass sich kein Plateau einstellt. Mit zunehmender ^{14}C -IAA-Konzentration nimmt der Gehalt an gebundenem IAA auch weiter zu. Die Kurvenverläufe lassen darauf schließen, dass es Aminosäuren gibt, die für das Alkylierungsreagenz leicht und schnell erreichbar sind und dementsprechend auch schnell markiert werden (erste Phase). Danach, in der zweiten Phase des Systems, werden weniger gut erreichbare Aminosäuren markiert. Bei höheren ^{14}C -IAA-Konzentrationen ist ferner davon auszugehen, dass auch eine unspezifische Markierung erfolgt. In der ersten, „schnellen“ Alkylierungsphase konnten für das Wildtyp-Präparat $3,03 \pm 0,015$ mol gebundenes IAA pro mol Enzym gefunden werden, für das G::km-Präparat $4,00 \pm 0,017$ mol. Der weitere Kurvenverlauf des Wildtyp-Präparates zeigt außerdem, dass der Wert von $5,06 \pm 0,005$ mol gebundenes IAA bei einer eingesetzten IAA-Konzentration von 0,5 mM nach unten korrigiert werden muss und als Messfehler zu werten ist. Im weiteren Verlauf, also in der zweiten Phase, nimmt der Gehalt an gebundenem IAA dann weiter zu bis

hin zu einem Wert von $6,93 \pm 0,049$ mol IAA pro mol Enzym für das Wildtyp-Präparat bzw. $9,43 \pm 0,102$ mol IAA für das G::km-Präparat. Die Kurvenverläufe beider Präparate zeigen ähnliche Verläufe und die gleichen Trends. In beiden Präparaten ist davon auszugehen, dass kaum freie γ -Schwefel des Cystein³⁸⁸ vorliegen. Die wenigen Cysteine³⁸⁸, die möglicherweise im Zuge der IAA-Inkubation alkyliert werden, tragen somit zu keiner maßgeblichen Änderung der Kurvenverläufe bei. Die IAA-Konzentration, die zur Alkylierung des Cystein³⁸⁸ notwendig ist, kann daher aus den Kurvenverläufen nicht ermittelt werden.

Für beide Präparate wurde zusätzlich mit nicht-radioaktivem IAA für verschiedene Konzentrationen ein möglicher Einfluss des Alkylierungsreagenz auf die CO-oxidierende Aktivität untersucht. Wie bereits beschrieben ist in beiden Präparaten kaum freies Cystein³⁸⁸ vorhanden, dennoch konnte aber nicht ausgeschlossen werden, dass IAA mit anderen Aminosäuren in der direkten Umgebung des [CuSMoO₂]-Clusters reagiert und die Aktivität hemmt. Die Aktivitätsmessungen wurden nach 1 h Inkubation mit der entsprechenden IAA-Konzentration durchgeführt. Es konnte dabei allerdings kein Einfluss auf die Aktivität verzeichnet werden. Die Aktivität des Wildtyp-Präparates (Abb. 3-35, ●) sank geringfügig von 2,91 U/mg auf 2,13 U/mg, beim G::km-Präparat (Abb. 3-35, ■) war keine Änderung erkennbar. Wildtypische CO-Dehydrogenase wurde zusätzlich mit NEM in identischen Endkonzentrationen inkubiert (nicht gezeigt), auch hier konnten keine Auswirkungen auf die CO-oxidierende Aktivität festgestellt werden.

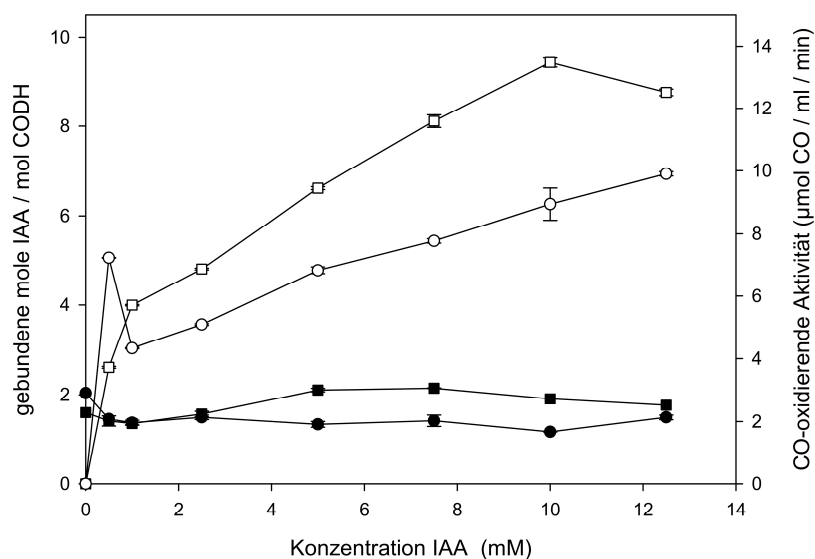


Abbildung 3-35: Konzentrationsabhängige Alkylierung von CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* OM5 (Wildtyp und *coxG*-Mutante) mit ^{14}C -Iodacetamid.

CO-Dehydrogenase-Präparate des Wildtyps (○) und der *coxG*-Mutante (□) (jeweils 3 mg/ml in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ pH 8,5) wurden mit verschiedenen ^{14}C -Iodacetamid (IAA) - Konzentrationen inkubiert. Jeder Konzentrationsstufe wurden im Vorfeld 400.000 dpm ^{14}C -IAA zugesetzt. Der Überschuss an ^{14}C -Iodacetamid wurde durch Ammoniumsulfat-Präzipitation und viermaliges „Waschen“ der Proteinfraction entfernt und 4,33 nmol CO-Dehydrogenase in Szintillationsröhrchen mit 10 ml Szintillationscocktail überführt und gemessen (Kap. 2.32.1). Mit nicht radioaktiv-markiertem IAA wurde für das Wildtyp-Präparat (●) und das Präparat der *coxG*-Mutante (■) der Einfluss auf die CO-oxidierende Aktivität verfolgt (Kap. 2.31 und 2.24.1).

Um einen freien γ -Schwefel am Cystein³⁸⁸ zu erzeugen und zur Untersuchung der Persulfid-Hypothese (Abb. 3-33) wurde das CO-Dehydrogenase Wildtyp-Präparat durch Inkubation mit KCN inaktiviert (Kap. 2.29.1) und in einem weiteren Ansatz nach KCN-Inaktivierung mit Sulfid und Dithionit sulfuriert (Kap. 2.29.2). Beide Ansätze wurden in analoger Weise mit unterschiedlichen Konzentrationen an IAA inkubiert (pro Konzentrationsstufe 400.000 dpm ^{14}C -IAA) und schließlich der Anteil an gebundenem IAA über Szintillationsmessungen bestimmt. Die hier erhaltenen Kurven (Abb. 3-36) zeigten erneut einen biphasischen Verlauf und ähneln denen des unbehandelten Wildtyp-Präparates und des Ansatzes der *coxG*-Mutante. Zunächst kommt es wieder zu einem schnellen Anstieg im Gehalt an gebundenem IAA bis zu einer Konzentration von 1 mM IAA, danach geht der Verlauf in eine zweite Phase über. Auch hier wird kein Plateau erreicht, sondern ein fortschreitender langsamer Anstieg. Der Verlauf des Cyanid-behandelten Präparates (Abb. 3-36, ○) entsprach dabei dem des sulfurierten

Ansatzes (Abb. 3-36, ■). Eine Bestimmung des cyanolysierbaren Schwefels (Kap. 2.27.1) dieses Ansatzes ergab im Vorfeld $2,05 \pm 0,059$ mol S pro mol Enzym. Darüber hinaus wurde ein unvollständig sulfurierter Ansatz mit verschiedenen IAA-Konzentrationen inkubiert (Abb. 3-36, □). Dieser besaß einen Schwefelgehalt von $1,17 \pm 0,073$ mol Schwefel pro mol Enzym. Zu erkennen ist, dass im Vergleich zum vollständig sulfurierten Präparat in diesem Ansatz deutlich weniger IAA gebunden werden konnte, auch wenn sich der gleiche biphasische Kurvenverlauf zeigt. Anzunehmen wäre, dass sich eine mögliche Bindung von IAA am Cystein³⁸⁸ unabhängig vom Sulfurierungsgrad vollzieht. So wäre bei einem Cyanid-behandelten Präparat ohne cyanolysierbaren Schwefel eine IAA-Bindung am γ -Schwefel des Cystein³⁸⁸ denkbar. Liegt das Präparat teilweise oder vollständig sulfuriert vor, müsste IAA am γ -Schwefel oder Persulfid des Cystein³⁸⁸ binden. Im Gegensatz dazu zeigt sich jedoch, dass zwischen der Markierung durch ¹⁴C-IAA und dem Sulfurierungsgrad kein Zusammenhang besteht bzw. der Sulfurierungsgrad nicht für die Bindung von IAA maßgeblich ist.

Sulfurierungsexperimente von IAA-behandelten [MoO₃]-Präparaten konnten zeigen, dass die Alkylierungsreaktion keinen Einfluss auf den Einbau von cyanolysierbarem Schwefel in das aktive Zentrum hat (Abb. 3-36, ●). So konnten nach Inkubation der [MoO₃] – CO-Dehydrogenase mit verschiedenen Konzentrationen an nicht radioaktiv-markiertem IAA durch Sulfurierung 1,31 - 1,63 mol cyanolysierbaren Schwefels pro mol Enzym in das aktive Zentrum eingebaut werden. Unter der Annahme, dass IAA in der Lage ist, das aktive Zentrum von CO-Dehydrogenase zu erreichen und das Cystein³⁸⁸ zu alkylieren, würde dieser Befund gegen ein Rekonstitutionsmodell sprechen, bei dem sich der Sulfurierungsschritt am Cystein³⁸⁸ unter Bildung eines Persulfids vollzieht, da nach Alkylierung eine Sulfurierung des γ -Schwefels nicht mehr möglich wäre.

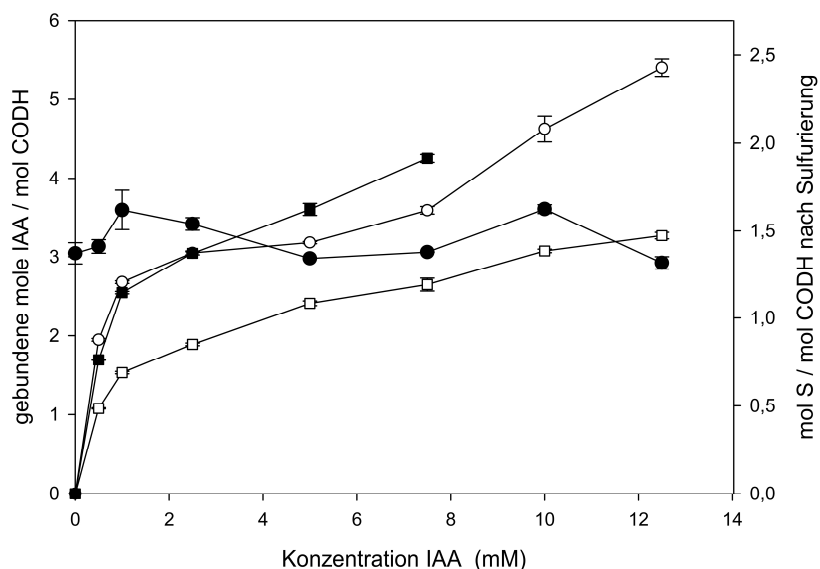


Abbildung 3-36: Konzentrationsabhängige Alkylierung von KCN-inaktivierter und sulfurierter CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* OM5 mit ^{14}C -Iodacetamid.

Zur Erzeugung eines $[\text{MoO}_3]$ -Ions im aktiven Zentrum wurde CO-Dehydrogenase des Wildtyps von *O. carboxidovorans* OM5 mit Cyanid inaktiviert (Kap. 2.29.1) und der Überschuss an KCN durch Gelfiltration abgetrennt. Ein Teil des Ansatzes wurde anschließend mit Sulfid/Dithionit sulfuriert (Kap. 2.29.2) und überschüssige Schwefelreaktanten ebenfalls durch Gelfiltration abgetrennt. Das $[\text{MoO}_3]$ -Präparat (\circ), ein sulfuriertes Enzym mit 2,05 mol S (\blacksquare) also auch mit 1,17 mol S pro mol Enzym (\square) (jeweils 3 mg/ml in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ pH 8,5) wurden mit verschiedenen ^{14}C -Iodacetamid (IAA) - Konzentrationen unter anoxischen Bedingungen 1 h inkubiert. Jeder Konzentrationsstufe wurden im Vorfeld 400.000 dpm ^{14}C -IAA zugesetzt. Der Überschuss an ^{14}C -Iodacetamid wurde durch Ammoniumsulfat-Präzipitation und viermaliges „Waschen“ der Proteinfraction entfernt und 4,33 nmol CO-Dehydrogenase in Szintillationsröhrchen mit 10 ml Szintillationscocktail überführt und gemessen (Kap. 2.32.1). $[\text{MoO}_3]$ -Präparate wurden zusätzlich mit verschiedenen Konzentrationen an nicht-radioaktiv-markiertem IAA inkubiert. Nach Abtrennung des Alkylierungsmittels wurden die Ansätze mit Sulfid/Dithionit inkubiert und der Gehalt an cyanolysierbarem Schwefel ermittelt (\bullet) (Kap. 2.27.1).

Der Vergleich der Ansätze mit unvollständigem Cluster im aktiven Zentrum mit den Ansätzen vollständig assemblierter Enzyme (Abb. 3-36 bzw. Abb. 3-35) zeigt, dass das Cystein³⁸⁸ nicht „bevorzugt“ alkyliert wird. Betrachtet man das Cyanid-inaktivierte Enzym, würde man erwarten, dass zusätzlich zur unspezifischen Bindung 2,0 mol ^{14}C -IAA pro mol Enzym am Cystein³⁸⁸ gebunden werden. Dies kann jedoch den Kurvenverläufen nicht entnommen werden. Der schnelle Anstieg der IAA-Bindung bis 1 mM ist sowohl bei einem unbehandelten Wildtyp-Präparat als auch bei dem Cyanid-inaktivierten Ansatz vorhanden. Würde es sich bei diesem schnellen Anstieg um die Alkylierung des Cystein³⁸⁸ handeln,

dürfte diese Phase nicht im Verlauf des unbehandelten Enzyms zu finden sein. Vielmehr sprechen die erhaltenen Kurvenverläufe dafür, dass sich eine mögliche Alkylierung des Cystein³⁸⁸ in der zweiten Phase vollzieht, unter der auch die unspezifische Bindung des IAA fällt.

Da nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte, dass die chemische Rekonstitution der Assemblierung des Metallclusters *in vivo* entspricht, war es wichtig, „natürliche“ Biosynthese-Vorstufen zu untersuchen. Mit der CO-Dehydrogenase aus der *coxD*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 lag ein Enzym mit einem „natürlichen“ [MoO₃]-Ion im aktiven Zentrum vor (Pelzmann et al. 2009). Dieses wurde in analoger Weise mit unterschiedlichen ¹⁴C-IAA Konzentrationen inkubiert (Abb. 3-37, ○). Darüber hinaus wurde wie auch für das [MoO₃]-Wildtyp-Präparat eine Sulfurierung vor der jeweiligen IAA-Inkubation durchgeführt. Dabei konnten Präparate mit $1,02 \pm 0,155$ mol (●) und $1,85 \pm 0,121$ mol (□) cyanolysierbaren Schwefel pro mol Protein erhalten werden. Die nachfolgende Inkubation mit verschiedenen ¹⁴C-IAA-Konzentrationen ergab Kurvenverläufe, die denen der Wildtyp-Präparate ähnelten. Sowohl das Präparat der *coxD*-Mutante, welches keinen cyanolysierbaren Schwefel enthält, als auch die sulfurierten Präparate gehen nach einem schnellen Anstieg (bis 1 mM IAA) in eine zweite Phase über. Auch hier stellt sich kein Plateau ein, mit zunehmender IAA-Konzentration nimmt auch der Gehalt an gebundenem ¹⁴C-IAA weiter zu. Zudem scheint der Sulfurierungsgrad ebenso keinen Einfluss auf die Alkylierungsreaktion zu haben. Im Ansatz der *coxD*-Mutante steigt der Anteil an gebundenem ¹⁴C-IAA zunächst auf $2,18 \pm 0,021$ mol IAA pro mol Enzym an (bei eingesetzten 1 mM IAA). Danach geht das System in eine weitere Phase über und hat bei einer Endkonzentration von 12,5 mM IAA im Ansatz einen Anteil von $3,96 \pm 0,093$ mol IAA pro mol Enzym gebunden. Die sulfurierten Ansätze zeigen ähnliche Verläufe: Im Ansatz mit 1,85 mol cyanolysierbaren Schwefel pro mol Enzym erfolgt zunächst ein Anstieg auf $1,68 \pm 0,025$ mol IAA pro mol Enzym, für das unvollständig sulfurierte Präparat mit 1,02 mol Schwefel pro mol Enzym werden in der ersten Phase $1,297 \pm 0,007$ mol gebundenes IAA pro mol Enzym detektiert. Im weiteren Verlauf steigt der Gehalt an gebundenem IAA dann weiter auf $3,60 \pm 0,04$ bzw. $2,23 \pm 0,086$ mol IAA pro mol Enzym an (Endkonzentration an eingesetztem IAA 12,5 mM).

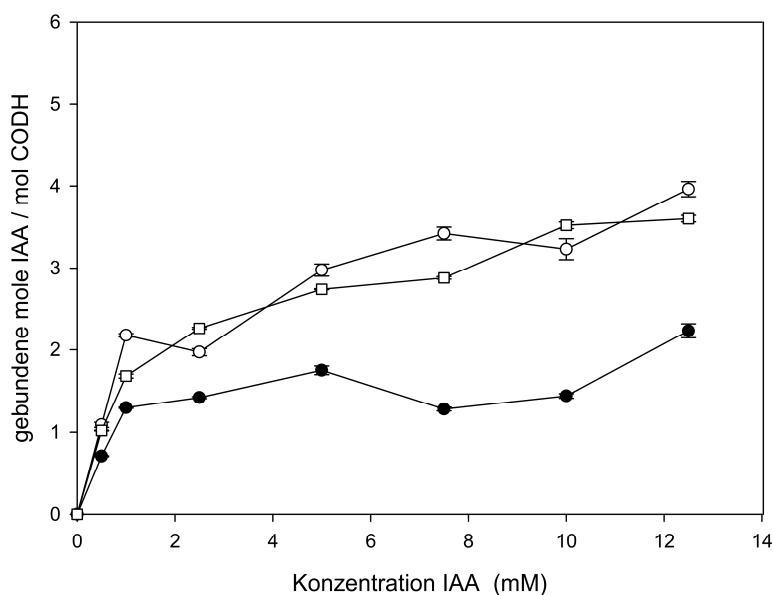


Abbildung 3-37: Konzentrationsabhängige Alkylierung von CO-Dehydrogenase Präparaten der *coxD*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 mit ^{14}C -Iodacetamid.

Das unbehandelte *coxD*-Präparat (○), ein sulfurierter Ansatz mit 1,85 mol S (□) und ein Präparat mit 1,02 mol S pro mol Enzym (●) (jeweils 3 mg/ml in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ pH 8,5) wurden mit verschiedenen ^{14}C -Iodacetamid (IAA) - Konzentrationen unter anoxischen Bedingungen 1 h inkubiert. Jeder Konzentrationsstufe wurden im Vorfeld 400.000 dpm ^{14}C -IAA zugesetzt. Der Überschuss an ^{14}C -Iodacetamid wurde durch Ammoniumsulfat-Präzipitation und viermaliges „Waschen“ der Proteinfraction entfernt und 4,33 nmol CO-Dehydrogenase in Szintillationsröhrchen mit 10 ml Szintillationscocktail überführt und gemessen (Kap. 2.32.1).

Unter Berücksichtigung der bisherigen Analysen, sollten nun neben der CO-Dehydrogenase aus der *coxD*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 auch die Enzyme der Mutanten-Stämme E::km und F::km analogen ^{14}C -Markierungen mit IAA unterzogen werden. Beide Enzymspezies besitzen nachweislich cyanolysierbaren Schwefel. Läge dieser Schwefel in Form eines Persulfids am Cystein³⁸⁸ vor, so sollte eine spezifische ^{14}C -Markierung mit IAA möglich sein. Der Anteil an gebundenem ^{14}C -IAA bei verschiedenen Endkonzentrationen in den Ansätzen sowie der daraus resultierende Kurvenverlauf waren v. a. von Interesse. Es sollte hier nicht nur die Fähigkeit des Enzyms IAA zu binden untersucht werden, sondern auch ein Vergleich mit der sulfurierten *coxD*-Mutante und des KCN-behandelten und sulfurierten WT-Präparates durchgeführt werden. Unterschiede könnten dabei einen entscheidenden Hinweis darauf geben, dass die chemische Rekonstitution des aktiven Zentrums einem anderen Mechanismus folgt als die Assemblierung des Metallclusters *in vivo*.

Die Präparate der *coxE*- und der *coxF*-Mutante (Abb. 3-38, □ bzw. ■) zeigen untereinander als auch im Vergleich zur sulfurierten und nicht-sulfurierten *coxD*-Mutante (Abb. 3-37, ● bzw. ○) ähnliche Profile und folgen den bisher festgestellten, biphasischen Trends. Der Gehalt an gebundenem ^{14}C -IAA steigt im Ansatz der *coxE*-Mutante zunächst auf $4,73 \pm 0,035$ mol pro mol Enzym an (bei einer eingesetzten IAA-Endkonzentration von 0,5 mM). Danach fällt dieser Anteil auf $3,21 \pm 0,016$ mol ab (Endkonz. 1 mM), was den Schluss zulässt, dass es sich bei den zuvor ermittelten $4,73 \pm 0,035$ mol um einen Messfehler handelt. Bei ^{14}C -IAA-Endkonzentrationen größer als 1 mM geht auch dieses System in eine zweite Phase über, die sich zunächst durch ein weiteres allmähliches Ansteigen des Anteils von gebundenem IAA bei höheren IAA-Endkonzentrationen auszeichnet, aber schließlich bei 7,5 mM IAA ein Plateau erreicht. Bei einer IAA-Endkonzentration von 10 mM im Ansatz können $5,32 \pm 0,100$ mol gebundenes IAA pro mol Enzym detektiert werden. Die ^{14}C -Markierung des Enzyms der *coxF*-Mutante folgt einem ähnlichen Verlauf: Nach einem schnellen Anstieg des Anteils an gebundenem ^{14}C -IAA auf $2,850 \pm 0,013$ mol pro mol Enzym bei einer Endkonzentration von 1 mM im Ansatz, kommt es auch hier in einer zweiten Phase zu einem langsamen, allmählichen Ansteigen des gebundenen IAA-Anteils. Ein Plateau wird allerdings nicht erreicht. Bei einer Endkonzentration von 12,5 mM IAA können $5,901 \pm 0,067$ mol gebundenes IAA pro mol Protein detektiert werden. Der Verlauf zeigt zudem, dass bei weiterer Erhöhung der IAA-Endkonzentration im Ansatz sich auch der Anteil von gebundenem IAA weiter erhöht.

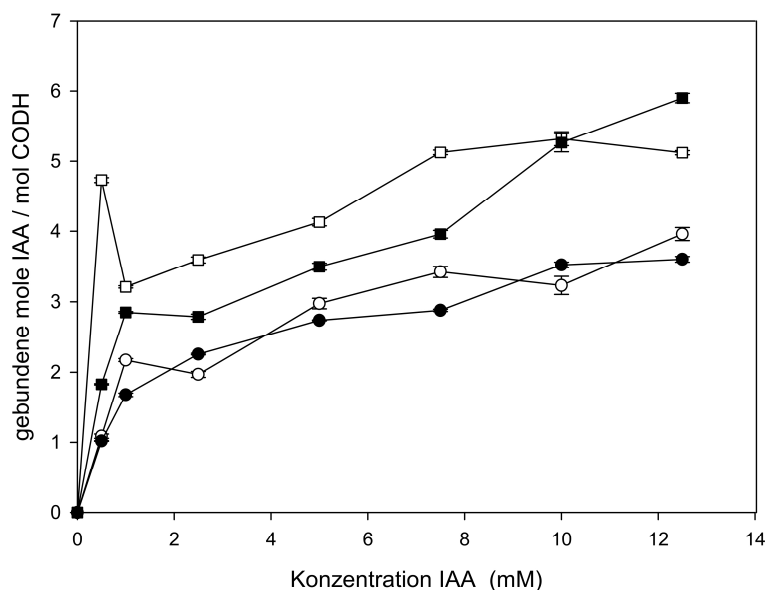


Abbildung 3-38: Konzentrationsabhängige Markierung verschiedener Präparate von CO-Dehydrogenase aus Mutanten von *O. carboxidovorans* OM5 mit ^{14}C -Iodoacetamid.

Das unbehandelte *coxD*-Präparat (○), ein sulfurierter Ansatz mit 1,85 mol S (●) und Präparate der *coxE*- (□) und *coxF*-Mutante (■) (jeweils 3 mg/ml in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ pH 8,5) wurden mit verschiedenen ^{14}C -Iodoacetamid (IAA) - Konzentrationen unter anoxischen Bedingungen 1 h inkubiert. Jeder Konzentrationsstufe waren im Vorfeld 400.000 dpm ^{14}C -IAA zugesetzt worden. Der Überschuss an ^{14}C -Iodoacetamid wurde durch Ammoniumsulfat-Präzipitation und viermaliges „Waschen“ der Proteinfraction entfernt. 4,33 nmol CO-Dehydrogenase wurden anschließend in Szintillationsröhrchen mit 10 ml Szintillationscocktail überführt und gemessen (Kap. 2.32.1).

Um gezielt das Cystein³⁸⁸ mit ^{14}C -IAA markieren zu können, wurde wildtypische CO-Dehydrogenase (mit nahe vollständigem $[\text{CuSMoO}_2]$ -Cluster) zunächst mit „kaltem“ IAA inkubiert (Kap. 2.31), um eine Alkylierung bzw. „Absättigung“ der Proteinoberfläche zu erreichen (Endkonzentration 2,5 und 5 mM). Nach Abtrennung des IAA-Überschusses wurde entweder eine sofortige Alkylierung mit ^{14}C -IAA in gleichen Endkonzentrationen durchgeführt (Kap. 2.32.1), oder aber erst nach vorheriger Inaktivierung mit KCN, um im aktiven Zentrum ein $[\text{MoO}_3]$ -Ion zu erzeugen, und damit einen freien γ -Schwefel am Cystein³⁸⁸. Der Vergleich der jeweiligen Ansätze mit oder ohne vorherige KCN-Inaktivierung sollte Aufschluss darüber geben, ob IAA das Cystein³⁸⁸ markieren kann, was nur für die inaktivierten Ansätze erwartet wurde. Nach KCN-Inaktivierung konnten $1,79 \pm 0,011$ mol bzw. $1,89 \pm 0,03$ mol ^{14}C -IAA pro mol Enzym für die Endkonzentrationen 2,5 mM bzw. 5 mM detektiert werden. Allerdings wurden auch ohne vorherige Inkubation mit KCN

$1,74 \pm 0,05$ mol bzw. $2,01 \pm 0,09$ mol ^{14}C -IAA gemessen. Die Daten lassen dementsprechend keinen Schluss zu, ob das Cystein³⁸⁸ von IAA erreicht und alkyliert wird. Da die ermittelten Mole an ^{14}C -IAA alle in der gleichen Größenordnung liegen, kann eher davon ausgegangen werden, dass es zu einem Austausch von ^{14}C -markiertem und unmarkiertem IAA im Rahmen der einstündigen Inkubation kommt.

Krishnan et al. (2011) sowie auch Pan und Carrol (2013) konnten u. a. zeigen, dass IAA an den γ -Schwefel von Cystein-Resten sowie an persulfidischen Schwefel binden kann. Durch die Zugabe von DTT konnte in letzterem Fall die Disulfidbrücke wieder gespalten werden, wodurch die IAA-Markierung entfernt wurde. In ähnlicher Weise wurde Cyanid-behandelte CO-Dehydrogenase des Wildtyps zunächst mit ^{14}C -IAA markiert und nach Entfernung des Überschuss an Alkylierungsreagenz mit DTT oder β -Mercaptoethanol (jeweils 10 mM) versetzt und 16 h inkubiert. Der Thiol-Überschuss und eventuelles ^{14}C -IAA wurden durch viermalige Ammoniumsulfatfällung entfernt, ehe Szintillationsmessungen durchgeführt wurden (Kap. 2.32.1). Dabei konnten für den DTT-Ansatz $1,80 \pm 0,024$ mol ^{14}C -IAA, für den β -Mercaptoethanol-Ansatz $2,26 \pm 0,018$ mol ^{14}C -IAA pro mol Enzym detektiert werden. Die radioaktive Markierung konnte somit nicht abgespalten werden, was erneute gegen die Persulfid-Hypothese (Abb. 3-33) spricht.

Analyse ^{14}C -IAA-markierter CO-Dehydrogenase mittels denaturierender PAGE

Mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese sollte parallel analysiert werden, welche Untereinheit von CO-Dehydrogenase in welchem Maße markiert wird und ob die Alkylierung mit ^{14}C -IAA während der Probenaufbereitung (z.B. Denaturieren der Proben mittels Kochpuffer, Kap. 2.17) und der eigentlichen Elektrophorese erhalten bleibt.

CO-Dehydrogenase des Wildtyps sowie der *coxD*-, *coxE*-, *coxF*- und *coxG*-Mutante wurden wie unter Kap. 2.32.1 beschrieben mit ^{14}C -IAA (3 mM, $2,0 \times 10^6$ dpm) inkubiert und der IAA-Überschuss durch viermaliges Waschen und Ausfällen des Proteins entfernt. Nach Lösen der Proteinpellets in Puffer wurden 200 μl Kochpuffer zugegeben und die Ansätze 5 min bei 100 °C inkubiert. Pro Bahn wurden 60 μg Protein auf ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen und die Banden der L-, M- und S-Untereinheit nach Färbung mit Coomassie Brilliant Blau ausgeschnitten und jeweils vereinigt. Nach Zerkleinerung wurden die Gelstücke durch Inkubation in H_2O_2 und wenigen Tropfen NaOH bei 60 °C aufgelöst und im Szintillationszähler analysiert. Szintillationsmessungen der verschiedenen

Ansätze wurden zusätzlich vor dem Auftragen der Proben auf das Gel durchgeführt. Hierzu wurde nach Zugabe des Kochpuffers und dem anschließenden Kochen TCA zugesetzt und die Ansätze niedertourig zentrifugiert. Pellet und Überstand wurden separat in Szintillationsröhrchen gemessen. Tab. 3-14 gibt einen Überblick über die verschiedenen Ansätze, die erhaltenen dpm sowie die hieraus berechneten Mole an gebundenem ^{14}C -IAA.

Tabelle 3-14: Detektierte Mole an ^{14}C -IAA in Proteinpellets und Überständen verschiedener Präparate von CO-Dehydrogenase nach TCA-Fällung.

Unterschiedliche Präparate an CO-Dehydrogenase (Typ CO-DH) wurden mit ^{14}C -IAA inkubiert. Nach Entfernen des Überschusses an Alkylierungsreagenz (Kap. 2.32.1) wurden die Ansätze für spätere Gelanalysen mit Kochpuffer behandelt. Vor dem Gelauftrag erfolgte eine TCA-Fällung. Pellet und Überstand wurden getrennt im Szintillationszähler analysiert.

Typ CO-DH	eingesetzte dpm	gemessene dpm	nMole IAA	nMole CO-DH	mol IAA/mol CO-DH
Wildtyp ÜS TCA	$2,0 \times 10^6$	445 ± 22	$0,267 \pm 0,013$	1,444	$0,185 \pm 0,009$
Wildtyp Pellet TCA	$2,0 \times 10^6$	4209 ± 34	$2,525 \pm 0,02$	1,444	$1,75 \pm 0,014$
E::km ÜS TCA	$2,0 \times 10^6$	834 ± 8	$0,50 \pm 0,005$	1,444	$0,35 \pm 0,004$
E::km Pellet TCA	$2,0 \times 10^6$	2332 ± 41	$1,40 \pm 0,025$	1,444	$0,97 \pm 0,017$
F::km ÜS TCA	$2,0 \times 10^6$	432 ± 16	$0,26 \pm 0,009$	1,444	$0,18 \pm 0,007$
F::km Pellet TCA	$2,0 \times 10^6$	4043 ± 37	$2,426 \pm 0,022$	1,444	$1,68 \pm 0,015$
G::km ÜS TCA	$2,0 \times 10^6$	467 ± 20	$0,28 \pm 0,013$	1,444	$0,194 \pm 0,009$
G::km Pellet TCA	$2,0 \times 10^6$	4815 ± 42	$2,889 \pm 0,025$	1,444	$2,0 \pm 0,017$

Die Daten in Tab. 3-14 verdeutlichen, dass die Fällung des CO-Dehydrogenase-Proteins mit TCA gleichermaßen geeignet ist, um den Protein-Anteil abzutrennen. Der ermittelte ^{14}C -IAA-Anteil in den Überständen nach TCA-Fällung ist als verhältnismäßig gering einzustufen (0,18 - 0,35 mol IAA pro mol Enzym), was verdeutlicht, dass die Probenaufbereitung (Kochpuffer, 100 °C für 5 min) keinen Einfluss auf die Alkylierung hat. Die ^{14}C -Markierung

bleibt somit erhalten, 0,97 - 2,0 mol ^{14}C -IAA pro mol Protein konnten hier im Pellet detektiert werden.

Die jeweiligen Szintillationsmessungen der aufgelösten Gelbanden der CoxL-, CoxM- und CoxS-Untereinheiten führten bei den verschiedenen Enzym-Präparaten zu stark schwankenden Ergebnissen. Zwar konnte der überwiegende ^{14}C -IAA-Anteil in der CoxL-Untereinheit detektiert werden, jedoch lag der Gehalt zwischen 0,37 und 1,287 mol pro mol Protein. In den Banden der CoxM- und CoxS-Untereinheit konnte nahezu kein ^{14}C -IAA nachgewiesen werden. Die mangelnde Reproduzierbarkeit der ^{14}C -IAA-Gehalte in den Gelbanden kann eventuell darauf zurückgeführt werden, dass letztere zur Auflösung der Gelmatrix 12 h in H_2O_2 und NaOH bei 60 °C inkubiert wurden. Goodman und Matzura (1970) beschrieben, dass H_2O_2 gerade bei erhöhten Temperaturen als starkes Oxidans wirkt, was häufig zum Verlust von ^{14}C -Radioaktivität in Form von $^{14}\text{CO}_2$ führt. In alkalischem H_2O_2 würden diese Probleme minimiert werden, die Wiederfindungsraten lagen aber trotzdem nur im Bereich von 50 - 58 %. Es ist daher davon auszugehen, dass im Rahmen der Inkubation $^{14}\text{CO}_2$ in unterschiedlichem Maße gebildet wurde und dies zu den enormen Schwankungen geführt hat. Die Gelexperimente zeigten, dass hauptsächlich die CoxL-Untereinheit alkyliert wird, in der sich auch das aktive Zentrum befindet. Dennoch kann diese Markierung auch als statistischer Prozess gewertet werden, da CoxL eine wesentlich größere molekulare Masse (88,7 kDa) gegenüber den anderen Untereinheiten (CoxM: 30,2 kDa; CoxS: 17,8 kDa) besitzt (Meyer et al. 1993a; Dobbek et al. 1999).

So konnten die Markierungsexperimente mit ^{14}C -IAA insgesamt keine Hinweise darauf geben, an welcher Position sich der cyanolysierbare Schwefel im aktiven Zentrum der CO-Dehydrogenase der *coxF*-Mutante befindet. Vollständig assemblierte Präparate des Wildtyps und der *coxG*-Mutante wurden gleichermaßen in einem biphasischen Verlauf alkyliert wie Cyanid-inaktivierte Spezies mit einer $[\text{MoO}_3]$ - *active site*, sulfurierte Spezies oder Präparate der *coxD*-, *coxE*- und *coxF*-Mutante. Auch konnte kein Zusammenhang zwischen dem Sulfurierungsgrad Sulfid/Dithionit-behandelter $[\text{MoO}_3]$ -Präparate und dem Alkylierungsgrad ermittelt werden. Die Sulfurierung selbst wird nicht durch eine vorherige IAA-Inkubation beeinträchtigt, allerdings gibt es keine direkten Anhaltspunkte, dass das Cystein³⁸⁸ im aktiven Zentrum durch IAA erreicht wird bzw. (bevorzugt) alkyliert wird.

3.21 Schwefelverbindungen als Reporter für Cu-defiziente active site-Cluster

Der in der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante detektierte cyanolysierbare Schwefel ($1,40 \pm 0,129$ mol pro mol Protein) könnte einerseits in Form eines Persulfids am Cystein³⁸⁸ vorliegen, oder andererseits in Form eines Sulfido-Liganden am Molybdän. Obwohl davon auszugehen ist, dass es sich bei dem Präparat um eine Biosynthese-Vorstufe handelt, unterscheidet sich das Apo-Enzym v.a. in seiner Rekonstituierbarkeit von einem Cyanid-inaktivierten und sulfurierten Wildtyp-Präparat (Kap. 3.15).

Kreß et al. (2014) konnten bereits zeigen, dass Schwefelverbindungen wie β -Mercaptoethanol, Natriumsulfid oder L-Cystein einen Einfluss auf die CO-oxidierende Aktivität wildtypischer CO-Dehydrogenase haben. Wird das Enzym mit der entsprechenden Schwefelkomponente inkubiert, so kommt es zu einer sofortigen Abnahme der Aktivität. Je nach Art der Schwefelverbindung und dessen eingesetzter Konzentration waren nach kurzer Zeit (10 min) teilweise nahezu keine CO-oxidierenden Aktivitäten mehr nachweisbar. Durch Abtrennen der Schwefelverbindung mittels Gelfiltration oder durch Verdrängung mittels CO-Begasung, Alkylierung der SH-Gruppe oder Oxidation mittels O_2 konnte die CO-oxidierende Aktivität vollständig oder zumindest teilweise wiederhergestellt werden. Kreß et al. (2014) schlossen hieraus auf eine reversible Bindung der SH-Verbindung mit dem $[CuSMoO_2]$ -Cluster im aktiven Zentrum von CO-Dehydrogenase. EXAFS-Messungen bestätigten schließlich die Bindung am Cu(I)-Ion. ESR-Untersuchungen bei 100 K zeigten außerdem, dass sich die Oxidationsstufe des Cu nicht verändert und bei +I verbleibt.

Eine eventuelle Bindung von Schwefelkomponenten wie β -Mercaptoethanol, Natriumsulfid oder L-Cystein an das Mo bzw. einen seiner Liganden sollte verwendet werden, Hinweise auf die Struktur des aktiven Zentrums der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante zu erhalten. Über Elektronspinresonanz sollten einhergehende Änderungen der Oxidationsstufe des Mo untersucht werden. Die Bindung des R-SH-Reagenz an das Mo oder einen seiner Liganden sollte demnach durch Veränderung des Redox-Zustandes zu einem signifikanten ESR-Signal führen bzw. zu einer Veränderung bereits vorhandener Signale.

Zunächst wurden zwei Wildtyp-Präparate von CO-Dehydrogenase getestet, welche sich sowohl im Cu-Gehalt als auch in ihrer CO-oxidierenden Aktivität unterschieden. Bei Präparaten von CO-Dehydrogenase ist generell davon auszugehen, dass es sich jeweils um ein Gemisch verschiedener Spezies handelt (Resch et al. 2005). So können verschiedene Biosynthese-Vorstufen mit einem $[MoO_3]$ -Ion als auch einem $[MoO_2S]$ im aktiven Zentrum

neben dem vollständig assemblierten $[\text{CuSMoO}_2]$ -Cluster vorkommen (Gnida et al. 2003; Resch et al. 2005). Das eine der beiden getesteten Präparate besaß eine vergleichsweise geringe Aktivität von 1,60 U/mg und $1,31 \pm 0,087$ mol Cu pro mol Enzym bei einem Gehalt an cyanolysierbarem Schwefel von $1,92 \pm 0,046$ mol pro mol Protein. In diesem Präparat ist dementsprechend von einem erhöhten Anteil an $[\text{MoO}_2\text{S}]$ -Spezies auszugehen. Das andere Wildtyp-Präparat besaß eine Aktivität von 16,0 U/mg, einen Schwefelgehalt von $1,95 \pm 0,063$ mol pro mol Enzym sowie einen Cu-Gehalt von $1,89 \pm 0,101$ mol pro mol Enzym. Der $[\text{CuSMoO}_2]$ -Cluster sollte hier dementsprechend nahezu vollständig assembliert vorliegen. Die Proteinproben wurden unter anaeroben Bedingungen mit β -Mercaptoethanol, L-Cystein oder Na_2S inkubiert (Kap. 2.33) und die ESR-Spektren bei einer Temperatur von 120 K aufgenommen (Abb. 3-39).

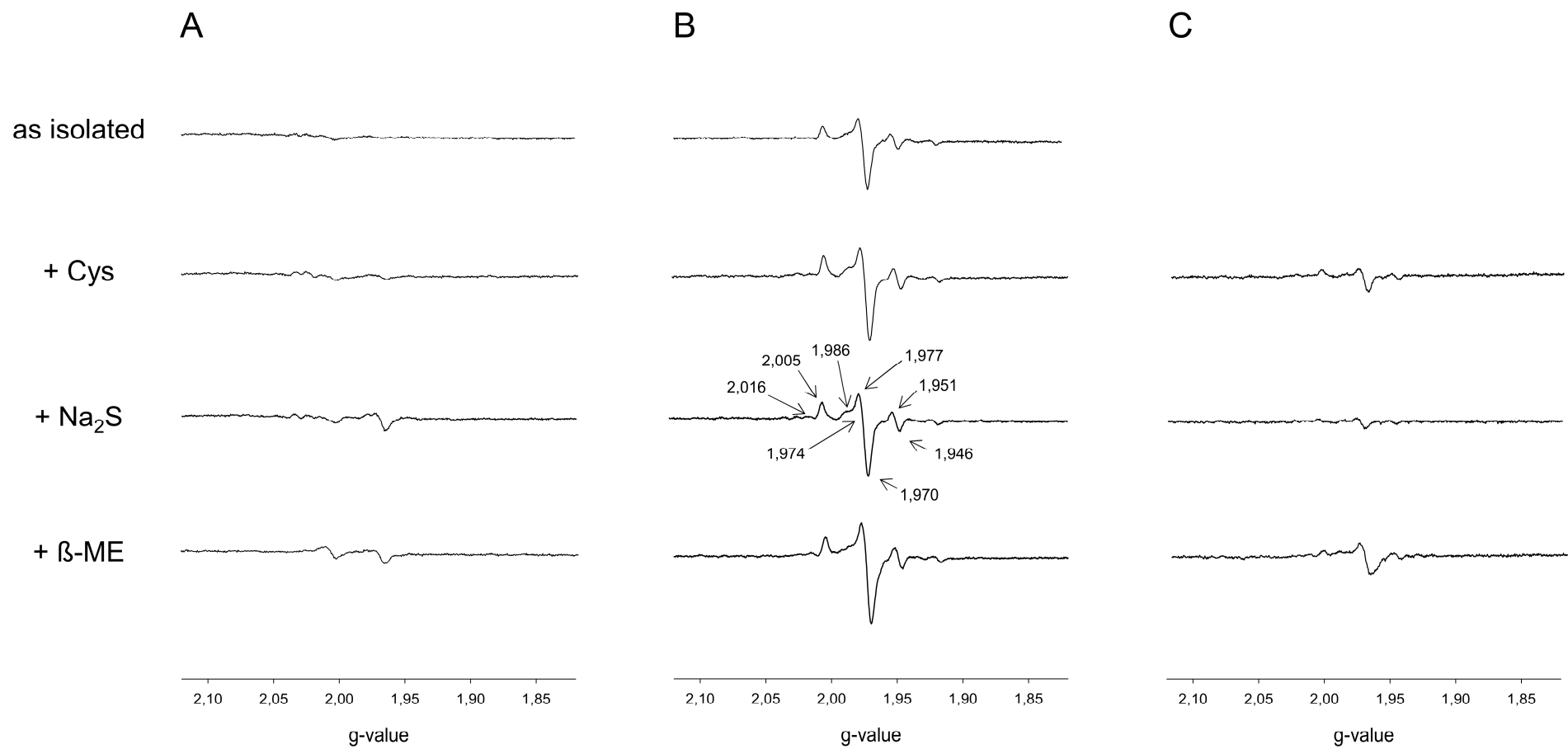


Abbildung 3-39: ESR-spektroskopische Analyse der CO-Dehydrogenase verschiedener Wildtyp-Präparate von *O. carboxidovorans* OM5 nach Inkubation mit Schwefelverbindungen.

Ein relativ hoch-aktives (16 U/mg), mit Schwefel und Kupfer nahezu vollständig besetztes Präparat (A) und ein Präparat mit niedriger CO-oxidierender Aktivität (1,60 U/mg) und reduziertem Cu-Gehalt (1,31 mol Cu pro mol Enzym) (B) wurden im anaeroben Zustand vor und nach der Inkubation mit Schwefelverbindungen ESR-spektroskopisch untersucht. Die Enzym-Proben wurden mit 15 mM L-Cystein, 15 μ M Na₂S oder 15 mM β -Mercaptoethanol 25 min inkubiert, anschließend in ESR-Röhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und mittels ESR vermessen (Kap. 2.26.2). Die Aufnahme der ESR-Spektren erfolgte bei einer Temperatur von 120 K, einer Mikrowellenfrequenz von 9,47 GHz, 1 mT Modulationsamplitude und 10 mW Mikrowellenleistung. Nach ESR-spektroskopischer Analyse wurden für das weniger aktive CO-Dehydrogenase-Präparat (B) Differenzspektren erzeugt, indem vom jeweiligen ESR-Signal nach Inkubation das Spektrum vor der Behandlung mit der entsprechenden Schwefelverbindung abgezogen wurde (C).

Im anaeroben Zustand ohne weitere Zugabe von Schwefelverbindungen zeigt das CO-Dehydrogenase-Präparat mit der Aktivität von 16 U/mg kein ESR Signal, was auf eine diamagnetische Molybdän-Spezies hindeutet. Auch die Behandlung mit R-SH-Verbindungen führt zu keiner signifikanten Änderung (Abb. 3-39, A). Kreß et al. (2014) konnten zeigen, dass der Verlust der CO-oxidierenden Aktivität durch Inkubation mit Schwefelkomponenten auf eine Bindung letzterer am Cu(I) zurückzuführen ist. Im Zuge dieser Bindung werden keine Elektronen auf das Mo-Zentrum übertragen, der Oxidationszustand des Mo verändert sich nicht. Dementsprechend bleibt das ESR *silent*. Für Cu-defiziente Präparate kann stattdessen ein höherer Anteil an [MoO₂S]-Spezies angenommen werden. Ein solches Enzym (Abb. 3-39, B) zeigt sowohl vor, als auch nach der Inkubation mit Schwefelverbindungen ein paramagnetisches Mo(V)-Signal mit $g_1 = 2,016$, $g_2 = 2,005$, $g_3 = 1,986$, $g_4 = 1,977$, $g_5 = 1,970$, $g_6 = 1,951$, $g_7 = 1,946$ und $g_{av} = 1,974$. Das Molybdän befindet sich damit zumindest teilweise in der Oxidationsstufe +V (12,38 % paramagnetisches Mo durch Spin-Integration). Ein derartiges Spektrum, ein resting Mo(V)-Signal, kann somit auf natürlich vorkommende [MoO₂SH]-Spezies zurückgeführt werden (Bray et al. 1983; Peariso et al. 2003). Die Inkubation mit R-SH-Verbindungen verändert das ursprüngliche ESR-Signal nahezu nicht, was die Differenzspektren aus R-SH-behandeltem und unbehandeltem Enzym zeigen (Abb. 3-39, C).

Eine Interaktion oder Bindung von Schwefelverbindungen am aktiven Zentrum erfordert einen Sulfido-Liganden am Molybdän und geht einher mit der Erzeugung eines paramagnetischen ESR-Signals. Dies konnte anhand von Schwefel- und Kupfer-defizienten Präparaten bestätigt werden. So wurde das Wildtyp-Präparat mit einer Aktivität von 16,0 U/mg (vgl. Abb. 3-39, A) mit Cyanid inaktiviert (Kap. 2.29.1), um ein $[\text{MoO}_3]$ -Ion im aktiven Zentrum zu erzeugen. Das Enzym wurde mit verschiedenen Schwefelverbindungen inkubiert und ESR-Spektren vor und nach der Inkubation aufgenommen (Abb. 3-40, A). Hierbei zeigte sich, dass die $[\text{MoO}_3]$ -Spezies unter anaeroben Bedingungen ohne Zugabe von R-SH-Verbindungen diamagnetisch ist (weniger als 3 % paramagnetisches Mo durch Spin-Integration) und daher nahezu ESR *silent*. Das Mo befindet sich in der Oxidationsstufe +VI. Die Inkubation mit den angeführten Schwefelkomponenten führt wie schon beim aktiven Wildtyp-Präparat zu keiner Veränderung im ESR, es finden dementsprechend keine Redox-Interaktionen statt, bei denen ein Elektron auf das $[\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}_3]$ -Zentrum übertragen wird. Die Voraussetzung für die Bindung einer Schwefelkomponente am Mo-Zentrum ist demzufolge das Vorhandensein eines Sulfido-Liganden, der im Cyanid-behandelten Enzym nicht mehr vorliegt.

Wird ein $[\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}_3]$ -Zentrum mit Schwefel rekonstituiert, so erfolgt die Sulfurierung mit Sulfid unter Dithionit-reduzierenden Bedingungen (vgl. Kap. 2.29.2, Resch et al. 2005). Nach Resch et al. (2005) kommt es dabei am Molybdän zu einem Liganden-Austausch von Sauerstoff gegen Schwefel, so dass eine $[\text{MoO}_2\text{S}]$ -Spezies erzeugt wird. Johannes (2003) stellte die Hypothese auf, dass die Abspaltung des Oxo-Liganden durch Reduzierung des Molybdän-Zentrums im Zuge der Dithionit-Zugabe erleichtert wird. So würde eine Reduktion die Mo-S-Bindung durch Besetzung antibindender π^* -Orbitale schwächen. Das Dithionit ermöglicht somit diesen Austausch, verhindert aber gleichzeitig, dass am $[\text{MoO}_2\text{S}]$ eine weitere Sulfurierung stattfindet und ein $[\text{MoO}_2\text{S-SH}]$ gebildet wird. Das reduzierende Milieu unterbindet somit die Ausbildung eines Persulfids.

Die Behandlung eines $[\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}_3]$ mit Schwefelverbindungen führt wie bereits erwähnt zu keiner wesentlichen Änderung im ESR-Spektrum. Es ist davon auszugehen, dass es zu keiner Bindung der R-SH-Verbindung an das $[\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}_3]$ -Zentrum kommt und keine Elektronen übertragen werden. Eine Inkubation mit Sulfid in Abwesenheit von Dithionit führt demnach zu keiner Sulfurierung des Mo, was sich auch in der nicht vorhandenen Rekonstituierbarkeit mit Cu(I) äußert (vgl. Tab. 3-15). Analog zur Rekonstitution des cyanolysierbaren Schwefels wurde versucht, Schwefelverbindungen wie L-Cystein, β -Mercaptoethanol oder Natriumsulfid unter Dithionit-reduzierenden Bedingungen an das

Molybdän zu binden. Die entsprechende R-SH-Komponente und Dithionit wurden in einem zeitlichen Abstand von 25 min in Endkonzentrationen von jeweils 15 mM zum Ansatz hinzugegeben. Im Anschluss wurden ESR-Spektren bei 120 K aufgenommen (Abb. 3-40, B). Dabei ergab sich für das L-Cystein/Dithionit behandelte $[\text{MoO}_3]$ -Präparat ein rhombisches Mo(V)-*slow*-Signal (Meyer et al. 2000), welches dem Signal eines $[\text{MoO}_3]$ oder $[\text{MoO}_2\text{S}]$ nach Dithionit-Behandlung entspricht (vgl. Kap. 3.18) (Resch et al. 2005). Über Spin-Integration konnte der Anteil von paramagnetischem Mo(V) zu 55,0 % berechnet werden. Wird die $[\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}_3]$ -Spezies mit Sulfid in Gegenwart von Dithionit inkubiert (was einer Sulfurierung gleich kommt), so zeigt sich ein ausgeprägtes resting Mo(V)-Signal (20,9 % paramagnetisches Mo), welches dem des Cu-defizienten Wildtyps entspricht und auf ein $[\text{Mo}^{\text{V}}\text{O}_2\text{S}]$ hindeutet. Somit zeigt sich gleichzeitig, dass der Sulfurierungsschritt bei der chemischen Rekonstitution zur Erzeugung eines Sulfido-Liganden am Molybdän führt und nicht zur Ausbildung eines Persulfids am Cystein³⁸⁸. Die Zugabe von β -Mercaptoethanol unter Dithionit-reduzierenden Bedingungen erzeugt ein abgewandeltes Mo(V)-Signal mit 35,5 % paramagnetischen Mo. Für alle drei Schwefelverbindungen ergeben sich somit signifikante Änderungen des ESR-Spektrums gegenüber dem unbehandelten Präparat, was auf die Änderung des Oxidationszustandes vom Molybdän auf +V schließen lässt und damit auf den Transfer eines Elektrons im Zuge der Bindung der Schwefelkomponente an das Molybdän. Die Art der R-SH-Verbindung scheint dabei für das erhaltene ESR-Spektrum entscheidend zu sein.

In Zusammenarbeit mit Dr. A. Pelzmann (Lehrstuhl Mikrobiologie, Universität Bayreuth) wurde die CO-Dehydrogenase aus der *coxD*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 ESR-spektroskopisch untersucht. Bei diesem Enzym liegt das aktive Zentrum als $[\text{MoO}_3]$ -Ion vor, der Gehalt an Sulfanschwefel ist mit $0,13 \pm 0,02$ mol pro mol Protein äußerst gering und damit auch der Anteil vorkommender $[\text{MoO}_2\text{S}]$ -Spezies (Pelzmann 2008). Die Inkubationen mit Schwefelverbindungen und die ESR-spektroskopischen Messungen wurden analog zum Cyanid-behandelten Wildtyp-Präparat durchgeführt und zeigten nach Inkubation in Abwesenheit von Dithionit ein resting Mo(V)-Signal (Abb. 3-40, C), welches in seiner Intensität jedoch deutlich schwächer ausfiel als das Signal des Sulfid/Dithionit-behandelten $[\text{MoO}_3]$ (Abb. 3-40, B). In allen drei Fällen kann das Signal auf die Bindung der Schwefelkomponente an den noch in geringem Umfang vorhandenen cyanolysierbaren Schwefel zurückgeführt werden. Da dessen Gehalt höher ausfällt als im Cyanid-behandelten Wildtyp-Präparat (Abb. 3-40, A), ergibt sich ein von der Intensität her stärkeres Signal. Wird die Inkubation unter Dithionit-reduzierenden Bedingungen durchgeführt (Abb. 3-40, D), so

kommt es zu einer leichten Intensivierung des resting Mo(V)-Signals beim L-Cystein/Dithionit-Ansatz. Wesentliche Änderungen in der Gestalt des Spektrums ergeben sich für den Sulfid/Dithionit- und β -Mercaptoethanol/Dithionit-Ansatz. Für letzteren entspricht das ESR-Signal jenem des β -Mercaptoethanol/Dithionit-behandelten Wildtyp-[MoO₃]-Präparates (Abb. 3-40, B), was die Bindung an das Molybdän unter Dithionit-reduzierenden Bedingungen unterstreicht.

Somit kann in Gegenwart von Dithionit eine R-SH-Verbindung an ein [MoO₃]-Zentrum binden, was zur Ausbildung einer [Mo^VO₂-SR] führt und sich ESR-spektroskopisch in Form eines signifikanten paramagnetischen Mo(V)-Signals zeigt.

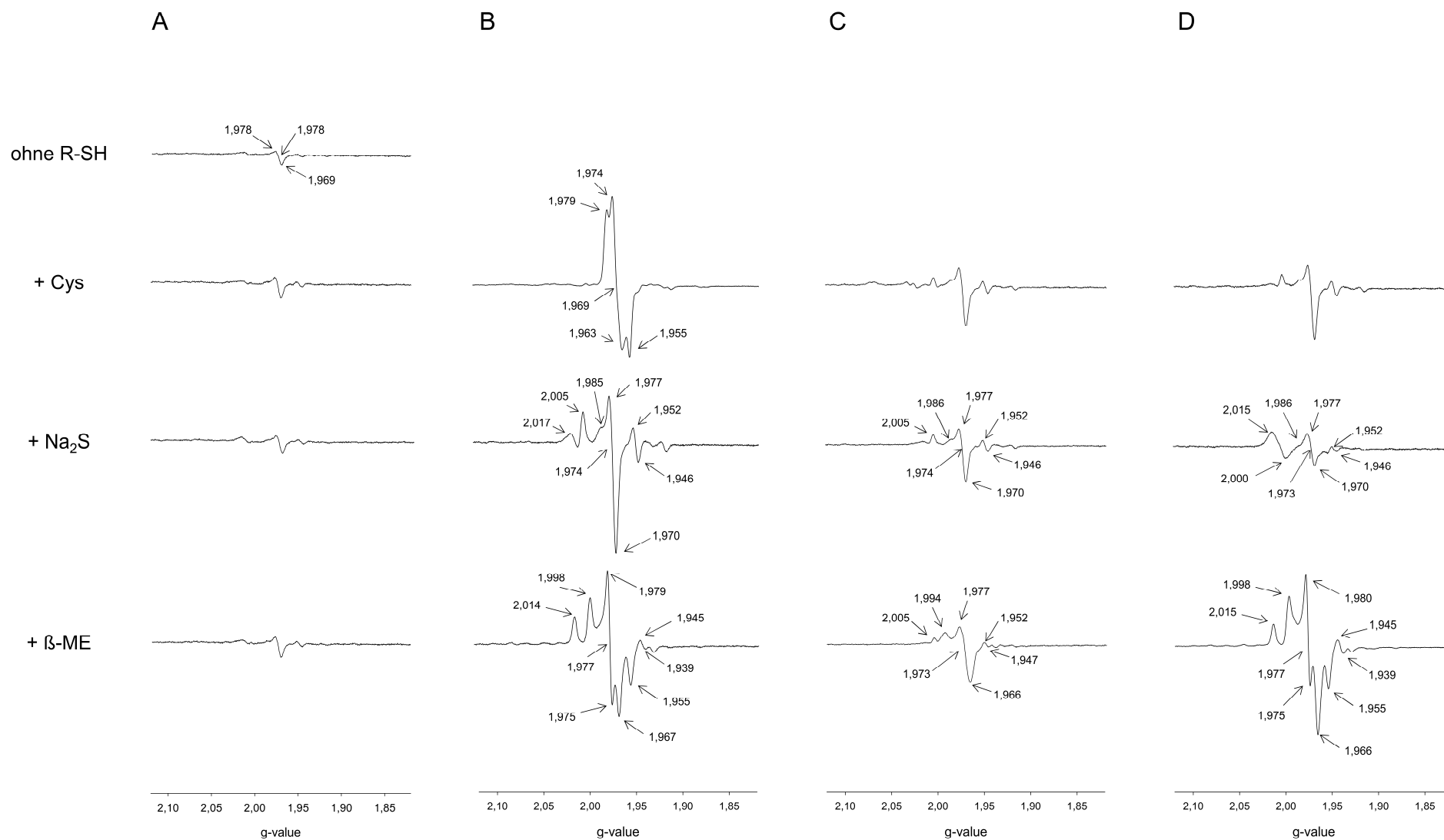


Abbildung 3-40: ESR-spektroskopische Analyse verschiedener [MoO₃]-Spezies von CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* OM5 nach Inkubation mit Schwefelverbindungen.

Ein Cyanid-behandeltes Wildtyp-Präparat (A, B) sowie die CO-Dehydrogenase aus der *coxD*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 (C, D) wurden unter anaeroben Bedingungen vor und nach der Inkubation mit Schwefelverbindungen ESR-spektroskopisch untersucht. In beiden Fällen ist von einem [MoO₃]-Ion als Hauptspezies im aktiven Zentrum auszugehen. Die Inkubation erfolgte ohne oder in Gegenwart von Dithionit. Für Ansätze in Abwesenheit von Dithionit (A und C) wurden die Enzym-Proben entweder mit 15 mM L-Cystein, 15 µM Na₂S oder 15 mM β-Mercaptoethanol 25 min inkubiert. Ansätze unter Dithionit-reduzierenden Bedingungen (B und D) wurden zunächst 25 min mit der entsprechenden Schwefelverbindung inkubiert (15 mM β-Mercaptoethanol, 15 mM L-Cystein oder 15 mM Na₂S) und anschließend mit 15 mM Dithionit versetzt. Sämtliche Proben wurden in ESR-Röhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und mittels ESR vermessen (Kap. 2.26.2). Die Aufnahme der ESR-Spektren wurde bei einer Temperatur von 120 K und einer Mikrowellenfrequenz von 9,47 GHz durchgeführt, die Modulationsamplitude betrug 1 mT, die Mikrowellenleistung 10 mW.

Aufgrund seiner Intensität wurde das Signal in B, Spur „+ Cys“ um 50 % nach unten skaliert.

Wie bereits erwähnt, kann ESR-spektroskopisch für ein Cu-defizientes Wildtyp-Präparat bei 120 K ein resting Mo(V)-Signal erhalten werden, welches auf natürlich vorkommenden [Mo^VO₂S]-Zentren basiert. Dieses Signal kann daher gewissermaßen als „Reporter“ für das Vorliegen eines Sulfido-Liganden am Molybdän und damit einer [MoO₂S]-Spezies im aktiven Zentrum dienen. Mittels ESR kann gezeigt werden, dass die Sulfurierungsreaktion im Zuge der chemischen Rekonstitution zu einem Ligandenaustausch am Molybdän führt und einen Oxo- durch einen Sulfido-Liganden ersetzt. So zeigt ein Cyanid-behandeltes und resulfuriertes Präparat unter anaeroben Bedingungen bei 120 K ebenfalls das beschriebene resting Mo(V)-Signal (Bray et al. 1983; Peariso et al. 2003) (Abb. 3-41, A). Spin-Integration ergab einen Anteil von 7 % an paramagnetischem Mo(V). Durch Inkubation des Ansatzes mit Sulfid (in Abwesenheit von Dithionit) kann dieses Signal in seiner Intensität geringfügig verstärkt werden (13 % paramagnetisches Mo (V)), was den Schluss nahe legt, dass es zur Ausbildung einer [Mo^VO₂S-SH]-Spezies kommt. Die Behandlung mit L-Cystein und β-Mercaptoethanol führt zu einer erheblichen Intensivierung des ESR-Signals (32 % bzw. 26 % Mo(V)), was ebenfalls auf die Bindung der entsprechenden Schwefelkomponente am äquatorialen Schwefel schließen lässt und damit auf die Bildung eines gemischten Disulfids [Mo(O₂)-S-S-R]. Die Intensivierung des Spektrums kann anhand von Differenzspektren verdeutlicht werden. Abb. 3-41, B zeigt die Differenzspektren der R-SH-behandelten Ansätze nach Abzug des entsprechenden Spektrums der unbehandelten Probe.

Kreß et al. (2014) konnten zeigen, dass R-SH-Komponenten am Cu-Ion des $[\text{CuSMoO}_2]$ -Clusters binden. Durch z.B. Gelfiltration oder Begasen der inhibierten Enzym-Probe mit reinem CO konnte die Schwefelverbindung allerdings wieder aus dem aktiven Zentrum herausverdünnt bzw. verdrängt werden, wodurch die CO-oxidierende Aktivität wiedererlangt wurde. In Cu-defizienten Enzym-Spezies erfolgt die Bindung der R-SH-Verbindung am äquatorialen Sulfido-Liganden des Mo, dennoch ist es aber zum Verständnis der chemischen Rekonstitution und des Aufbaus des aktiven Zentrums der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante wichtig, die Reversibilität der Bindung zu untersuchen. Nach Inkubation mit der entsprechenden Schwefelkomponente wurden die $[\text{Mo}^{\text{V}}\text{O}_2\text{S-S-R}]$ -Präparate mehrfach mit Puffer gewaschen und Ultrafiltrationen unterzogen, um die R-SH-Verbindungen ggf. zu entfernen. Im Anschluss wurden die Enzym-Proben erneut ESR-spektroskopisch analysiert (Abb. 3-41, C). Dabei ergab sich für jeden Fall ein deutliches paramagnetisches Mo(V)-Signal. Für die anfangs Cystein-behandelte Probe konnte ein resting Mo(V)-Signal erhalten werden, welches in seiner Intensität zwar schwächer ausfiel als das direkt nach Cystein-Inkubation detektierte Signal (14,6 % paramagnetisches Mo(V) gegenüber 31,7 %), aber dennoch deutlich stärker war als das Signal der unbehandelten $[\text{MoO}_2\text{S}]$ -Probe (7 % paramagnetisches Mo(V), Abb. 3-41, A). Für das Sulfid-behandelte Präparat konnte ebenfalls ein resting Mo(V)-Signal erhalten werden, welches im Wesentlichen dem ursprünglichen Signal entsprach. Das ESR-Spektrum des zuvor mit β -Mercaptoethanol behandelten Ansatzes glich dem Signal, welches für die $[\text{MoO}_3]$ -Probe nach β -Mercaptoethanol/Dithionit-Behandlung erhalten werden konnte mit den g -Werten $g_1 = 2,016$, $g_2 = 1,998$, $g_3 = 1,980$, $g_4 = 1,975$, $g_5 = 1,965$, $g_6 = 1,955$, $g_7 = 1,945$, $g_8 = 1,939$ und $g_{av} = 1,977$. Die erhaltenen Spektren nach den Ultrafiltrations- und Waschschritten zeigen damit, dass - entgegen der reversiblen Bindung von R-SH-Verbindungen an das Cu(I) vollständig assemblierter $[\text{CuSMoO}_2]$ -Zentren - die Bindung einer R-SH-Verbindung am Molybdän-Schwefel Cu-defizienter Spezies irreversibel ist.

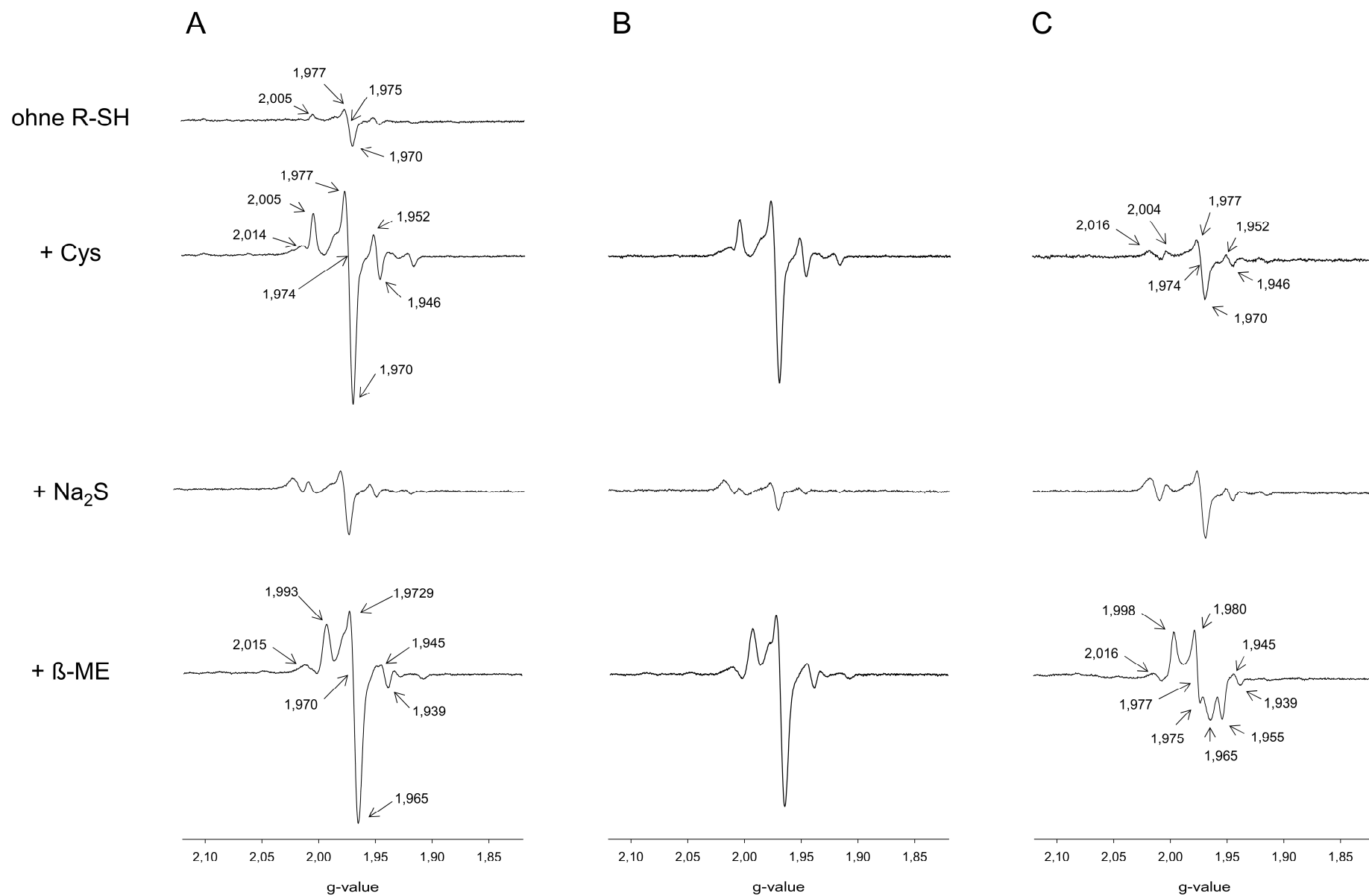


Abbildung 3-41: ESR-spektroskopische Analyse von [MoO₂S] - CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* OM5 nach Inkubation mit Schwefelverbindungen.

Ein Cyanid-behandeltes und sulfuriertes Wildtyp-Präparat (A) wurde unter anaeroben Bedingungen vor und nach der Inkubation mit R-SH-Verbindungen ESR-spektroskopisch untersucht. Als hauptsächliche Spezies kann ein [MoO₂S] im aktiven Zentrum angenommen werden. Die Cyanid-Inaktivierung und Sulfurierung erfolgten wie unter Kap. 2.29.1 und 2.29.2 beschrieben. Die Inkubation mit der entsprechenden Schwefelverbindung erfolgte in Abwesenheit von Na-Dithionit. Die Ansätze wurden entweder mit 15 mM L-Cystein, 15 μ M Na₂S oder 15 mM β -Mercaptoethanol inkubiert, anschließend in ESR-Röhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und mittels ESR vermessen (Kap. 2.26.2). Die Aufnahme der ESR-Spektren erfolgte bei einer Temperatur von 120 K und einer Mikrowellenfrequenz von 9,47 GHz, die Modulationsamplitude betrug 1 mT, die Mikrowellenleistung 10 mW. Nach ESR-spektroskopischer Vermessung wurden Differenzspektren erzeugt, indem vom jeweiligen ESR-Signal nach der R-SH-Behandlung das Spektrum vor der Inkubation abgezogen wurde (B). Nach Aufnahme der ESR-Spektren wurden die verschiedenen Ansätze aufgetaut und mehrfach mit Puffer gewaschen, gefolgt von Ultrafiltrationen, um die Reversibilität der Bindung der Schwefelkomponenten zu untersuchen. Im Anschluss wurden die Proben erneut in ESR-Röhrchen eingefroren und ESR-Spektren aufgenommen (C).

Eine irreversible Bindung von Schwefelverbindungen an den Sulfido-Liganden des Molybdäns (in Cu-defizienten Enzym-Spezies) sollte zudem einen Einfluss auf die Cu-Rekonstituierbarkeit haben. Nach Entfernen des R-SH-Überschusses durch Ultrafiltration wurde zusätzlich versucht, die verschiedenen Ansätze durch Zugabe eines Cu[SC(NH₂)₂]₃Cl-Komplexes zu einer aktiven Enzym-Spezies zu rekonstituieren. Dabei zeigte sich, dass durch die Inkubation mit Schwefelverbindungen die Aktivierbarkeit mit Cu(I) verloren geht. Ein [MoO₂S]-Präparat diente hierbei als Referenz und wurde ohne weitere Zugabe von R-SH-Verbindungen mit Cu(I) rekonstituiert. Hier konnte eine Aktivität von 8,35 U/mg erhalten werden (Tab. 3-15).

Tabelle 3-15: CO-oxidierende Aktivität verschiedener CO-Dehydrogenase (CODH) - Spezies nach Inkubation mit Schwefelverbindungen und nachfolgender Cu-Rekonstitution.

Die Präparate wurden jeweils mit den angegebenen R-SH-Komponenten für 25 min inkubiert (Kap. 2.33). Nach Abtrennung des R-SH-Überschusses wurden die Ansätze in 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 umgepuffert und mit 125 μ M Cu[SC(NH₂)₂]₃Cl versetzt. Die Werte der erhaltenen CO-oxidierenden Aktivitäten basieren auf mindestens drei unabhängigen Bestimmungen.

CODH-Spezies	Schwefelverbindung	spez. CO-oxidierende Aktivität nach Cu(I)-Zugabe (U/mg)
MoO ₂ S	---	8,35 \pm 0,189
	β -Mercaptoethanol	0,10 \pm 0,010
	Na-Sulfid	0,09 \pm 0,010
	Cystein	0,32 \pm 0,020
MoO ₃	Na-Sulfid	0,00 \pm 0,00
	β -Mercaptoethanol	0,04 \pm 0,001

Die bisherigen ESR-Spektren der [MoO₃]- und [MoO₂S]-Präparate zeigten, dass Schwefelverbindungen mit einer Sulfhydryl-Gruppe irreversibel an den Sulfido-Liganden des Molybdäns binden bzw. dieser die Voraussetzung für die Bindung an ein Cu-defizientes Zentrum ist. Im Zuge dieser Bindung wird ein Elektron auf das Mo übertragen, welches seinen Oxidationszustand von +VI auf +V ändert und ein paramagnetisches ESR-Signal bei 120 K erzeugt. In analoger Weise wurden ESR-Spektren der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante bei 120 K vor und nach der Inkubation mit Schwefelverbindungen aufgenommen. Bereits im *as isolated* Zustand zeigte das Mutanten-Enzym ein Mo(V)-Signal (18 % paramagnetisches Mo(V)) (Abb. 3-42, A; Abb. 3-30, A, Spur a), welches dem Spektrum des Wildtyp-[MoO₂S]-Präparates nach Na₂S-Inkubation ähnelte (Abb. 3-41, A). Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei dem in der CO-Dehydrogenase der *coxF*-Mutante nachgewiesenen, cyanolysierbaren Schwefel (vgl. Kap. 3.13) um einen Sulfido-Liganden des Molybdäns handelt. Die Behandlung mit Schwefelkomponenten führte zu einer Intensivierung des Signals. So konnten nach Inkubation mit L-Cystein 21 %, mit Na₂S und β -Mercaptoethanol jeweils 24 % paramagnetisches Mo detektiert werden (Abb. 3-42, A), was sich auch anhand der Differenzspektren (Abb. 3-42, B) zeigt. Hier wurde von den ESR-Spektren nach Inkubation mit der entsprechenden Schwefelkomponente das Spektrum im *as isolated* Zustand abgezogen. In allen drei Fällen kann ein klares resting Mo(V)-Signal

ausgemacht werden, was auf eine Bindung der jeweiligen R-SH-Verbindung an das Mo-Zentrum hindeutet.

Die erhaltenen Daten lassen auf die Koexistenz zweier unterschiedlicher, sulfurierter Mo-Spezies im Präparat der *coxF*-Mutante schließen. So können die Spektren im *as isolated* Zustand (auch durch Vergleich mit dem Spektrum des Sulfid-behandelten Wildtyp-[MoO₂S]-Präparats) auf ein persulfidisches [Mo(=O)OH₍₂₎SSH] zurückgeführt werden (Anteil 18 %), welches die Cu-Rekonstituierbarkeit stark einschränkt (nur 1,12 U/mg, vgl. Kap. 3.15). Aus den Differenzspektren nach Behandlung mit R-SH-Verbindungen ergibt sich der Anteil von [Mo(=O)OH₍₂₎SH] als zweite Spezies (3 - 6 %). Diese in geringem Maße vorkommende Spezies kann mit Cu(I) zu einem aktiven Enzym rekonstituiert werden (vgl. Kap. 3.15). Die Differenz zu 100 % kann durch das Vorliegen von [Mo(=O)₂OH₍₂₎]-Zentren als hauptsächliche Spezies erklärt werden (76 - 79 %). Dies erklärt zudem die enorme Aktivitätssteigerung auf 6,75 U/mg nach Rekonstitution mit Sulfid/Dithionit und Cu(I). Es zeigt sich somit, dass es sich bei der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante um ein inhomogenes Präparat handelt, welches drei verschiedene Typen an Metallzentren enthält: [Mo^{VI}(=O)₂OH₍₂₎] > [Mo^V(=O)OH₍₂₎SSH] > [Mo^{VI}(=O)OH₍₂₎SH]. Dabei zeigt nur die persulfidische Spezies ein paramagnetisches Mo(V)-Signal im ESR (Abb. 3-42, A).

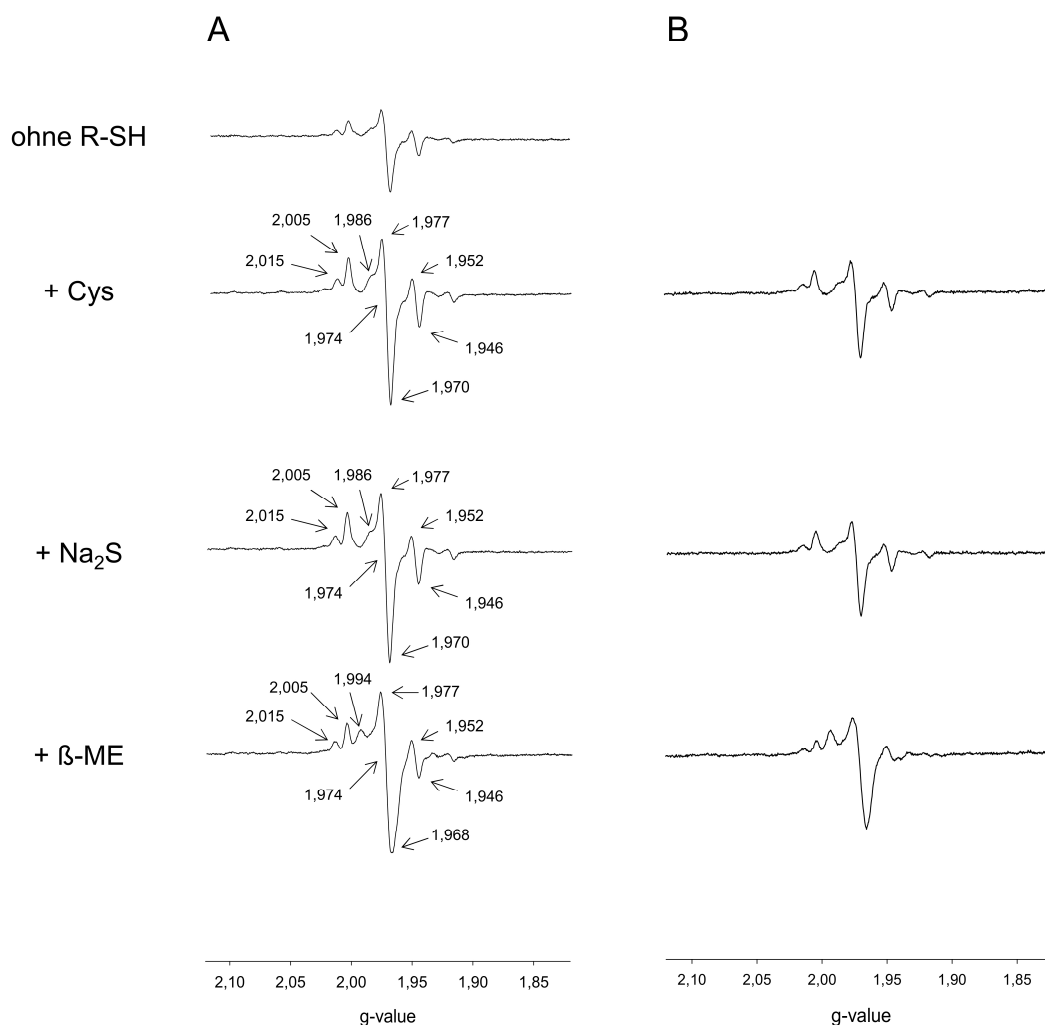


Abbildung 3-42: ESR-spektroskopische Analyse der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 nach Inkubation mit Schwefelverbindungen.

Die aufgereinigte CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 wurde im luftoxidierten Zustand vor und nach der Inkubation mit R-SH-Verbindungen ESR-spektroskopisch analysiert (Kap. 2.26.2). Die Inkubation erfolgte in Abwesenheit von Na-Dithionit. Ansätze wurden jeweils mit 15 mM L-Cystein, 15 μ M Na₂S oder 15 mM β-Mercaptoethanol 25 min lang inkubiert, anschließend in ESR-Röhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und mittels ESR vermessen. Die Aufnahme der ESR-Spektren wurde bei einer Temperatur von 120 K und einer Mikrowellenfrequenz von 9,47 GHz durchgeführt, die Modulationsamplitude betrug 1 mT, die Mikrowellenleistung 10 mW. Nach ESR-spektroskopischer Analyse wurden Differenzspektren erzeugt, indem vom jeweiligen ESR-Signal nach der R-SH-Behandlung das Spektrum vor der Inkubation abgezogen wurde (B).

Die chemisch bestimmten 1,4 mol cyanolysierbaren Schwefels pro mol Protein verteilen sich damit auf zwei Spezies: ein persulfidisches $[\text{Mo}^{\text{V}}(=\text{O})\text{OH}_{(2)}\text{SSH}]$ sowie ein einfach sulfuriertes $[\text{Mo}^{\text{VI}}(=\text{O})\text{OH}_{(2)}\text{SH}]$. Die mittels ESR-Spektroskopie erhaltenen Daten erklären zudem die Aktivitätssteigerungen, die im Rahmen von Rekonstitutionsexperimenten erhalten werden konnten. Nach Cyanid-Inaktivierung konnte das aktive Zentrum mit Sulfid/Dithionit und durch anschließende Zugabe eine Cu(I)-Thioharnstoff-Komplexes schrittweise wiederaufgebaut und eine CO-oxidierende Aktivität von 7,89 U/mg erhalten werden. Dieser Wert kann als maximal erreichbare CO-oxidierende Aktivität des Präparates bei der chemischen Rekonstitution angesehen werden (100 %). Hiervon ausgehend kann nun über die erhaltenen CO-oxidierenden Aktivitäten der verschiedenen Rekonstitutionsansätze der jeweilige Anteil der Spezies berechnet werden. Wird das Präparat mit Sulfid/Dithionit behandelt und anschließend mit Cu(I) inkubiert, so werden die $[\text{Mo}^{\text{VI}}(=\text{O})_2\text{OH}_{(2)}]$ -Zentren zum $[\text{Mo}^{\text{VI}}(=\text{O})\text{OH-S-Cu-S-Cys}]$ aufgebaut. Darüber hinaus wird durch die Cu-Zugabe auch der $[\text{Mo}^{\text{VI}}(=\text{O})\text{OH}_{(2)}\text{SH}]$ -Anteil rekonstituiert. Die erhaltene Aktivität von 6,75 U/mg (85,6 %) spiegelt damit die Summe der Spezies $[\text{Mo}^{\text{VI}}(=\text{O})_2\text{OH}_{(2)}]$ und $[\text{Mo}^{\text{VI}}(=\text{O})\text{OH}_{(2)}\text{SH}]$ wider. Die alleinige Cu-Rekonstitution mit Cu(I)-Thioharnstoff aktiviert ausschließlich das $[\text{Mo}^{\text{VI}}(=\text{O})\text{OH}_{(2)}\text{SH}]$ -Zentrum. Die erhaltenen 1,12 U/mg entsprechen 14,2 %. Aus der Differenz der Prozentsätze kann der alleinige $[\text{Mo}^{\text{VI}}(=\text{O})_2\text{OH}_{(2)}]$ -Anteil zu 71,4 % berechnet werden. Damit ergeben sich 14,4 % für die persulfidische $[\text{Mo}^{\text{V}}(=\text{O})\text{OH}_{(2)}\text{SSH}]$ -Spezies. In Tab. 3-16 sind die Anteile der verschiedenen Typen an Metallzentren, welche über ESR-Spektroskopie und die chemischen Rekonstitutionen ermittelt werden konnten, gegenübergestellt.

Tabelle 3-16: Prozentuale Anteile der drei Typen an Metallzentren in der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5.

Die mittels ESR-Spektroskopie und über Rekonstitutionsexperimente erhaltenen Prozentsätze für die jeweiligen Spezies sind einander gegenübergestellt.

	Metallzentrum		
	$[\text{Mo}^{\text{VI}}(=\text{O})_2\text{OH}_{(2)}]$	$[\text{Mo}^{\text{V}}(=\text{O})\text{OH}_{(2)}\text{SSH}]$	$[\text{Mo}^{\text{VI}}(=\text{O})\text{OH}_{(2)}\text{SH}]$
Anteil über ESR	76-79 %	18 %	3-6 %
Anteil über chemische Rekonst.	71,4 %	14,4 %	14,2 %

Wie Translationsanalysen gezeigt haben (Kap. 3.7), konnten in den Mutantenstämmen E::km und F::km von *O. carboxidovorans* OM5 die Polypeptide CoxE und CoxF gleichermaßen nicht detektiert werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die CO-Dehydrogenase-Präparate aus beiden Mutanten identisch sein müssen bzw. das Präparat der *coxE*-Mutante gleichermaßen aus verschiedenen Metallzentren bestehen muss. Im Rahmen der Aufklärung der Struktur des Enzyms der *coxE*-Mutante durch Dr. A. Pelzmann (Lehrstuhl Mikrobiologie, Universität Bayreuth) konnten in ESR-Experimenten Spektren erhalten werden, die auf die gleiche Zusammensetzung des *coxE*-Präparates schließen lassen. Auch hier ergab sich im *as isolated* Zustand ein paramagnetisches ESR-Signal bei 120 K, dessen Anteil durch Spin-Integration auf 23 % berechnet werden konnte. Durch die Inkubation mit R-SH-Verbindungen (L-Cystein, Na₂S und β -Mercaptoethanol) ließ sich die Signalintensität signifikant steigern, mit 25 - 44 % paramagnetischen Mo. Wie für das Präparat der *coxF*-Mutante können drei verschiedene Typen an Metallzentren angenommen werden: [Mo^{VI}(=O)₂OH₍₂₎] zu 56 - 75 %, [Mo^V(=O)OH₍₂₎SSH] zu 23 % und [Mo^{VI}(=O)OH₍₂₎SH] zu 2 - 21 % (Dr. A. Pelzmann, persönliche Mitteilung).

3.22 Anreicherung von rekombinantem CoxF aus Einschlusskörpern von *E. coli* AD494(DE3)/pSL1

CoxF konnte im heterologen Expressionssystem in *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 mit hohen Expressionsraten angereichert werden (Kap. 3.3). CoxF machte dabei 34,96 % des Gesamtzellproteins aus und wurde sowohl in löslicher Form im Cytoplasma als auch in Form von Einschlusskörpern gebildet. Ein Ansatz, CoxF in einem möglichst hohen Reinheitsgrad zu erhalten, bestand darin, das Protein zunächst in Form von Einschlusskörpern anzureichern. Nach Solubilisierung der Einschlusskörper sollte das Polypeptid schließlich rückgefaltet werden. Die Anreicherung von rekombinantem CoxF aus Einschlusskörpern wurde fünffach durchgeführt, mit vergleichbaren Ausbeuten und Anreicherungs faktoren. Nachfolgend soll exemplarisch der Verlauf einer Anreicherung dargestellt werden. Nach Aufschluss der Zellen (37,5 g Feuchtwicht) wurden die Einschlusskörper durch niedertourige Zentrifugation (Kap. 2.11 und 2.14.1) pelletiert und vom übrigen löslichen und partikulären Protein abgetrennt. Der Anteil von CoxF im Sediment als Einschlusskörper konnte videodensitometrisch zu 32,0 % bestimmt werden (Abb. 3-43, Bahn „uEK“; Tab. 3-17; sowie Kap. 3.4, Abb. 3-5, Bahn „EK“). Dies verdeutlicht, dass kontaminierende Proteine noch zu

einem hohen Anteil vorhanden waren. Dabei handelte es sich vermutlich um kopräzipitierte Membran-Partikel oder um Proteine, welche an den Einschlusskörpern adsorbiert vorlagen. Als Hauptkontaminanten konnten zwei Proteine mit geringerer Mobilität mit molekularen Massen von 39,7 und 35,3 kDa ausgemacht werden, welche nach Zentrifugation in einer viskosen grauen Phase direkt oberhalb des Sediments zu finden waren (Abb. 3-43, Bahnen VP1-4). Durch vierfaches Waschen der Einschlusskörper (Kap. 2.14.1) konnten diese Kontaminanten abgereichert werden. Nach Durchführung des letzten Waschschrilles, der Entfernung des Detergenz und der Aufnahme des rekombinanten Proteins in Puffer, betrug der Reinheitsgrad 91,0 % bei einem Anreicherungsfaktor von 2,8 und 38,6 % Ausbeute. Der Verlauf der Anreicherung des rekombinanten CoxF ist in Tab. 3-17 zusammengefasst.

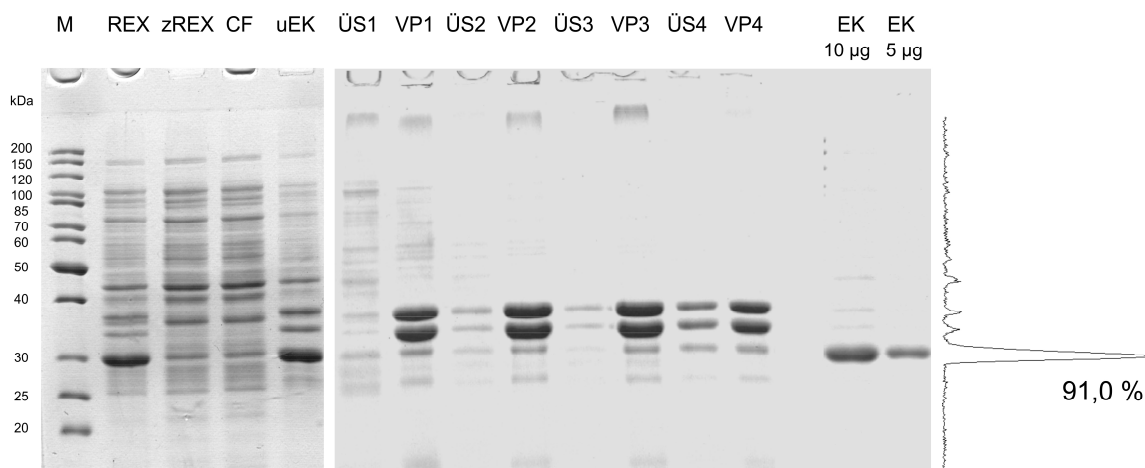


Abbildung 3-43: SDS-PAGE zum Verlauf der Anreicherung von rekombinantem CoxF aus Einschlusskörpern.

Zellmaterial von *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 (37,5 g Feuchtwicht) wurde zunächst wie unter Kap. 2.11 beschrieben, aufgeschlossen. Der erhaltene Rohextrakt (REX) wurde niedertourig zentrifugiert und dadurch Zelltrümmer und ungewaschene Einschlusskörper (uEK) pelletiert sowie vom zellfreien Rohextrakt (zREX) abgetrennt. Das Pellet wurde anschließend in Waschpuffer (Kap. 2.14.1) aufgenommen und homogenisiert. Es folgte eine erneute niedertourige Zentrifugation bei 7.500 x g. Der Überstand (ÜS1) sowie eine viskose, graue Phase (VP1) oberhalb des Sediments wurden verworfen und der Waschschrille einmal mit einer niedertourigen Zentrifugation bei 7.500 x g (Überstände ÜS2 und VP2), sowie zwei weitere Male bei 5.000 x g wiederholt (ÜS3, VP3 und ÜS4, VP4). Das Detergenz wurde schließlich durch zweimalige Behandlung mit 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 entfernt und die gewaschenen Einschlusskörper (EK) im gleichen Puffer erneut aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff bei -80 °C schockgefroren. Der Verlauf der Anreicherung wurde mittels SDS-PAGE (Kap. 2.17) verfolgt. Soweit nicht anders vermerkt wurden 10 µg Protein pro Bahn aufgetragen. Apparente Molekulargewichte konnten durch Mitführen eines Proteinstandards (M) (PageRuler, Fermentas) berechnet werden. Der Anteil von CoxF in den verschiedenen (Wasch-)Fraktionen wurde videodensitometrisch am Coomassie Brilliant Blau-gefärbten Gel ermittelt (Kap. 2.23).

Tabelle 3-17: Anreicherung von rekombinantem CoxF aus Einschlusskörpern von *E. coli* AD494(DE3)/pSL1.

Für die verschiedenen Schritte der Anreicherung wurde die Gesamtmenge an Protein nach der Methode von Beisenherz et al. (1953) (Kap. 2.16.2) bestimmt, sowie über PAGE (Kap. 2.17) und videodensitometrische Auswertung (Kap. 2.23) der Anteil an rekombinantem CoxF berechnet. Ausgehend von diesen Daten konnten die Ausbeute und der Anreicherungsfaktor ermittelt werden.

	Gesamtprotein (mg)	Anteil CoxF (%)	Anteil CoxF (mg)	Anreicherungs- faktor	Ausbeute (%)
Rohextrakt (REX)	4110,60	32,41	1332,25	1,0	100
Pellet mit ungewaschenen Einschlusskörpern (uEK)	2184,0	32,0	698,88	0,99	52,5
gewaschene Einschlusskörper (EK)	564,4	91,0	513,60	2,8	38,6
zellfreier Rohextrakt (zREX)	2153,20	21,12	454,8		
Waschfraktionen:					
Überstand 1 (ÜS1)	174,0	6,65	11,56		
viskose Phase 1 (VP1)	355,5	9,63	34,2		
Überstand 2 (ÜS2)	67,5	25,06	16,92		
viskose Phase 2 (VP2)	355,5	7,0	24,88		
Überstand 3 (ÜS3)	9,3	11,25	1,05		
viskose Phase 3 (VP3)	371,1	6,43	23,88		
Überstand 4 (ÜS4)	11,1	25,45	2,82		
viskose Phase 4 (VP4)	156,0	12,36	19,28		

3.23 Rückfaltung von rekombinantem CoxF aus solubilisierten Einschlusskörpern aus *E. coli* AD494(DE3)/pSL1

Wie in Kap. 3.22 beschrieben, konnte rekombinantes CoxF in Einschlusskörpern durch niedertourige Zentrifugationen und entsprechende Waschschrte zu einem Reinheitsgrad von 91,0 % angereichert werden. Die Bildung derartiger unlöslicher Aggregate ist dabei der hohen Expressionsrate geschuldet. Im Idealfall enthalten solche Einschlusskörper ausschließlich das heterolog exprimierte Protein (Carrio und Villaverde 2001). Dieses besitzt jedoch in den meisten Fällen keine biologische Aktivität, da das Protein in einem ungefalteten oder falsch gefalteten Zustand akkumuliert vorliegt. Durch Solubilisierung der Einschlusskörper und durch Rückfaltung ist es jedoch möglich ein funktionelles Polypeptid zu erhalten (Singh und Panda 2005). Die Solubilisierung erfolgt durch den Einsatz chaotroper Reagenzien wie z.B. Harnstoff oder ionische Detergenzien wie N-Laurylsarkosin in entsprechend hohen Konzentrationen. Das Protein wird dabei zunächst in eine *random coil* - Konformation entfaltet. Durch die Zugabe von Thiolen wie DTT oder β -Mercaptoethanol können zudem falsch ausgebildete Disulfidbrücken gespalten werden. Wird das chaotrope Reagenz entfernt, so kommt es zur Rückfaltung des Proteins. Im Zuge dieses Prozesses besteht allerdings die Gefahr einer fehlerhaften Faltung, da jegliche Sekundärstruktur-Elemente fehlen und keine Interaktionen zwischen den Polypeptidketten möglich sind – und damit auch die Gefahr einer Aggregation des Proteins (Singh und Panda 2005).

Die Solubilisierung von CoxF erfolgte über eine hohe Harnstoff-Konzentration. Durch nachfolgende Verdünnung in einem alkalischen Milieu und die stufenweise Herabsetzung des pH-Wertes konnte das Protein schließlich rückgefaltet werden (Kap. 2.14.1). Die Rückfaltung erfolgte dabei in einem Tris-Puffersystem, um einer fehlerhaften Faltung des Proteins durch Cyanate entgegen zu wirken. So enthalten alkalische Harnstoff-Lösungen Cyanate in geringen Mengen, welche mit den Aminogruppen von Lysinen und Argininen reagieren könnten (Stark et al. 1960), was die korrekte Faltung von CoxF beeinflussen könnte. Die primäre Aminogruppe von Tris sollte diese Cyanate gegebenenfalls abfangen.

Einschlusskörper mit rekombinantem CoxF-Protein mit einer Konzentration von 5 mg/ml wurden unter Rührung auf Eis in 8 M Harnstoff solubilisiert. Im Zuge der Solubilisierung kam es zum Aufklaren der weiß-grauen Einschlusskörper-Suspension. Mittels denaturierender PAGE und Immunoblot konnte im Vorfeld gezeigt werden, dass homologes CoxF keine intra- oder intermolekularen Disulfidbrücken ausbildet (Kap. 3.6, Abb. 3-7). Folglich konnte im Renaturierungspuffer auf ein Redoxsystem zur Ausbildung von

Disulfidbrücken verzichtet werden. Für eine korrekte Rückfaltung des CoxF-Proteins sind des Weiteren zwei Faktoren von Bedeutung: die Konzentration des nicht-nativen Polypeptids sowie die Temperatur während des Rückfaltungsprozesses. Beide müssen optimiert werden, um eine Proteinaggregation zu vermeiden. So wurde die Rückfaltung bei einer niedrigen Proteinkonzentration von 50 µg/ml durchgeführt (Lilie et al. 1998; Vallejo und Rinas 2004) indem das solubilisierter CoxF (2,5 ml) tropfenweise in ein großes Volumen (97,5 ml) an Rückfaltungspuffer aufgenommen wurde. Dies stellte sicher, dass die Proteinkonzentration an ungefalteter CoxF stets minimal war. Zudem wurde der gesamte Rückfaltungsprozess auf Eis durchgeführt, da niedrige Temperaturen eine hydrophobe Aggregation unterdrücken (Vallejo und Rinas 2004). Im Anschluss an die Verdünnung wurde der pH-Wert der Lösung auf 9,0 eingestellt und in 24-stündigem Abstand um jeweils 0,2 pH-Einheiten gesenkt, bis ein finaler pH-Wert von 8,0 erreicht war. Der Erfolg der Rückfaltung wurde spektroskopisch überprüft. Im Bereich des sichtbaren Spektrums konnte dabei keine merkliche Streuung beobachtet werden. Dies zeigt, dass es zu keiner wesentlichen Aggregation während der Rückfaltung gekommen ist. Mittels der Absorption bei 280 nm ($A_{280} = 0,042$) und des berechneten, molaren Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{\text{CoxF}} = 12950 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) konnte die Proteinkonzentration im Rückfaltungsansatz berechnet werden. Der hier erhaltene Wert von 95,2 µg/ml entsprach in etwa 1/50 der eingesetzten CoxF-Konzentration von 5 mg/ml. Der Verlust an Protein war mit 9,52 % somit verhältnismäßig gering. Komponenten der Solubilisierungslösung wurden durch Dialyse entfernt, durch Ultrafiltration konnte der CoxF-Ansatz zu einer Endkonzentration von 1,56 mg/ml aufkonzentriert werden.

3.24 Das rekombinante, rückgefaltete CoxF aus Einschlusskörpern zeigt Sekundärstruktur-Elemente, ist aber dennoch instabil

Mittels des Programmes SABLE konnten bioinformatisch die Sekundärstruktur-Elemente berechnet werden (Kap. 3.1). Um diese Vorhersagen zu überprüfen, sollte mittels Circular dichroismus (CD) - Spektroskopie (Kap. 2.26.3) die Sekundärstruktur des rückgefalteten CoxF ermittelt bzw. ein Vergleich durchgeführt werden. Die CD-Spektroskopie sollte insbesondere darüber Aufschluss geben, ob CoxF die typischen Sekundärstruktur-Elemente wie α -Helices, β -Faltblätter oder *turns* besitzt oder eine eher zufällige, unnatürliche Struktur eingenommen hat. Es können dabei nicht nur Aussagen über

die vorliegende Konformation getroffen werden, sondern auch über die relative Verteilung von Strukturelementen.

Die CD-Spektroskopie basiert auf der Tatsache, dass zirkular-polarisiertes Licht mit links- und rechts-polarisierten Komponenten chiraler Zentren unterschiedlich wechselwirkt. Durch die unterschiedliche Absorption entsteht ellipitisch polarisiertes Licht. Der Circular dichroismus wird als Elliptizität (Θ) angegeben und berücksichtigt dabei die für beide Komponenten des zirkular-polarisierten Lichts typischen Absorptionskoeffizienten ($\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$):

$$\Theta(\lambda) = \Delta\epsilon \cdot c \cdot d \quad (10)$$

Im CD-Spektrum wird die Abhängigkeit der Elliptizität (Θ) von der Wellenlänge (λ) dargestellt. Der relative Anteil an Sekundärstruktur-Elementen lässt sich durch den Vergleich mit Referenz-Spektren von Proteinen mit bekannter Struktur ermitteln (Compton und Johnson 1986).

Fern-UV-Circular-Dichroismus-Spektren wurden von solubilisiertem CoxF nach Umpuffern in 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ pH 8,0 aufgenommen (Abb. 3-44, B). Nach dem Verfahren von Savitzky und Golay (1964) wurden die erhaltenen Rohdaten geglättet (B, *rote Linie*) und mit Hilfe des Online-Servers DICHROWEB die relativen Sekundärstruktur-Anteile berechnet. Die Spektren zeigten α -helikale Strukturen zu einem Anteil von 5 %, β -Faltblätter zu 38 % und *turns* zu 14 %, allerdings auch einen großen Anteil an nicht-gefalteten, ungeordneten Proteinabschnitten (43 %).

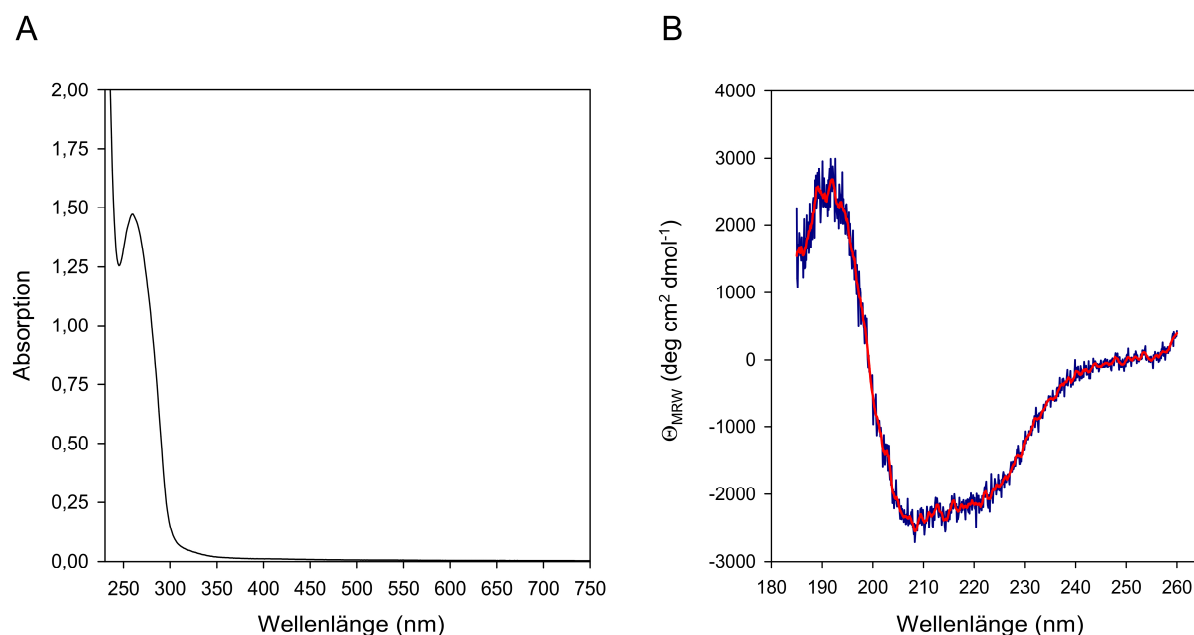


Abbildung 3-44: Absorptionsspektrum und CD-Spektrum von rückgefaltetem, rekombinantem CoxF aus solubilisierten Einschlusskörpern.

(A) Gewaschene Einschlusskörper aus *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 mit rekombinantem CoxF wurden in 8 M Harnstoff solubilisiert und das CoxF-Protein unter Rührung auf Eis in 20 mM Tris 50-fach verdünnt. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1,0 N HCl auf einen Wert von 9,0 gebracht und in 24-stündigem Abstand um jeweils 0,2 Einheiten gesenkt, bis ein finaler pH-Wert von 8,0 erreicht war (Kap. 2.14.1). Mittels Ultrafiltration wurde das rückgefaltete CoxF-Protein auf 1,56 mg/ml aufkonzentriert und ein Spektrum im Bereich 230 - 750 nm aufgenommen.

(B) CD-Spektrum von rückgefaltetem CoxF. Das Protein wurde hierfür in 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ pH 8,0 umgepuffert und auf eine Konzentration von 2,171 mg/ml gebracht. Die CD-Spektren wurden bei 20 °C mit einem Wellenintervall von 0,2 nm aufgenommen (Kap. 2.26.3). Im Anschluss wurden die erhaltenen Rohdaten in die mittlere molare Elliptizität umgerechnet (B, *blaue Linie*) und nach dem Verfahren von Savitzky und Golay (1964) geglättet (B, *rote Linie*). Unter Verwendung des Online-Servers DICHROWEB (Whitmore und Wallace 2004, 2008) konnten die relativen Anteile an Sekundärstruktur-Elementen berechnet werden.

Die durch CD-Spektroskopie berechneten Sekundärstrukturanteile weichen deutlich von der Strukturvorhersage durch SABLE ab. In Tab. 3-18 sind die Ergebnisse der CD-Spektroskopie den bioinformatischen Berechnungen durch SABLE gegenübergestellt.

Tabelle 3-18: Sekundärstrukturelemente des rückgefalteten rekombinanten CoxF-Proteins.

Die über CD-Spektroskopie errechneten Sekundärstruktur-Anteile sind den mittels SABLE (Kap. 2.35 und Kap. 3.1) ermittelten Daten gegenübergestellt.

	CD-Spektroskopie	Strukturvorhersage SABLE
α-Helices	5 %	30 %
β-Faltblätter	38 %	18 %
<i>turns</i>	14 %	} 52 %
ungeordnet	43 %	

Beim Vergleich der bioinformatisch vorhergesagten Sekundärstrukturelemente mit den mittels CD-Spektroskopie erhaltenen Daten (Tab. 3-18) ist zu erkennen, dass der Anteil an experimentell bestimmten α -Helices mit 5 % deutlich niedriger ausfällt als in der Strukturvorhersage (18 %). Umgekehrt verhält es sich für den Anteil an β -Faltblättern. Der über CD-Spektroskopie erhaltene Anteil ist mit 38 % wesentlich höher als der bioinformatisch vorhergesagte Gehalt. Lediglich der Anteil an ungeordneten Bereichen bzw. *turns* stimmt in der Summe weitestgehend überein. Bioinformatische Vorhersagen erfassen *turns* nicht als separates Strukturelement und fassen diese mit den ungeordneten Bereichen zusammen. Der Gesamtanteil beider Elemente beträgt nach SABLE 52 %, was in der Summe den über CD-Spektroskopie erhaltenen Werte für *turns* (14 %) und ungeordneten Bereichen (43 %) entspricht.

Insgesamt erlaubt der Vergleich der bioinformatischen Strukturvorhersage mit den experimentellen Daten der CD-Spektroskopie keine Aussage, ob der Rückfaltungsprozess unter den gewählten Bedingungen erfolgreich war und ein funktionelles CoxF-Polypeptid rückgefaltet werden konnte, welches seine native Konformation enthält. Zudem zeigte sich eine hohe Instabilität des Proteins, die sich darin äußerte, dass nach 48 - 72 h (bei 4 °C) eine deutliche Präzipitatbildung einsetzte. Letztere konnten nicht wieder in Lösung gebracht werden. Analysen (z. B. auf eine eventuelle Oligomerisierung hin, Kap. 3.25) wurden daher unmittelbar nach dem Rückfaltungsprozess durchgeführt. Auch ein Einfrieren in flüssigem N₂ und eine Lagerung bei -80 °C führten nach Auftauen zu einem deutlichen Proteinverlust in Form von Aggregatbildung. Diese Beobachtungen lassen daher auf eine eher unvollständige oder teilweise fehlerhafte Rückfaltung schließen. Die Präzipitation setzte auch bei Zugabe des Proteins zu verschiedenen Assays ein. So war es nicht möglich, für das Präparat der Rückfaltung eine Orthophosphat-Monoester-hydrolysierende Aktivität nachzuweisen

(vgl. Kap. 3.27). Auch die Bindung von Cu-Ionen konnte nicht gezeigt werden: Das CoxF-Polypeptid wurde hierzu unter anaeroben Bedingungen mit einem Cu(I)-Thioharnstoff-Komplex versetzt (Kap. 2.29.3) oder aber mit Cu(II)-Lösungen in verschiedenen Endkonzentrationen im mikromolaren Bereich. In allen Fällen kam es zum Ausfallen des Proteins bei Cu-Zugabe.

3.25 Das rekombinante, rückgefaltete CoxF aus Einschlusskörpern bildet Oligomere

Die Untersuchung der Sequenz ergab, dass CoxF ein Motiv charakteristisch für saure Histidin-Phosphatasen trägt (Kap. 3.1). Eine Subfamilie stellen die sog. Phytasen (*myo*-Inositol-Hexakisphosphat-Phosphohydrolasen) dar. Von Phytasen ist bekannt, dass sie unter sauren (als auch alkalischen) Bedingungen Komplexe mit Proteinen ausbilden können, was sich auf Struktur, Enzym-Aktivität und Löslichkeit auswirken kann (Kies et al. 2006). Dennoch ergab die bisherige Charakterisierung bakterieller Phytasen, dass es sich überwiegend um monomere Enzyme handelt.

CoxF weist darüber hinaus eine hohe Ähnlichkeit zu XdhC aus *R. capsulatus* auf (Kap. 3.1). Hierbei handelt es sich um ein Reifungsprotein von XDH, welches als Homodimer vorkommt (Neumann et al. 2007a; Neumann und Leimkühler 2010).

Saccharosedichtegradienten-Zentrifugationen (Kap. 3.9) zeigten dagegen, dass homologes CoxF als lösliches Protein in Form unterschiedlicher Oligomere vorkommt, welche von 3-meren, 4-meren und 6-meren bis hin zu 12-meren oder 18-meren reichen.

Das System zur Assemblierung der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* OM5 mit den Reifungsproteinen CoxD, CoxE und CoxF zeigt eine starke Analogie zum Mg-Chelatase-System. Maisel et al. (2012) konnten bereits zeigen, dass CoxD bevorzugt in drei unterschiedlichen oligomeren Formen vorkommt: Als funktionelle 2-mere und 6-mere mit ATPase-Aktivität und als nicht-funktionelle 4-mere. Als aktive „Hauptform“ wurde dabei das 6-mer ermittelt, dieses besaß unter den oligomeren Formen die höchste Aktivität. Geht man in Analogie zu Mg-Chelatase davon aus, dass die Reifung der CO-Dehydrogenase einen Komplex aus CoxD, CoxE und eventuell auch CoxF benötigt, so könnte auch CoxF entsprechende oligomere Strukturen ausbilden. Die Reifung könnte sich an einem Komplex vollziehen, der aus einem hexameren Ring von CoxD besteht, an dem ein hexamerer Ring von CoxE gebunden ist. Mit diesem wiederum könnte ein hexamerer Ring von CoxF interagieren.

Unter diesen Gesichtspunkten sollte eine eventuelle Oligomerisierung des rekombinanten CoxF-Proteins untersucht werden. Eine Auftrennung möglicher Oligomere sowie eine Bestimmung entsprechender molekularer Massen über nicht-denaturierende PAGE war nicht möglich, da CoxF an der Gelkante zu großem Anteil ausfiel und nicht in das Gel einwanderte. Der verbleibende Anteil konnte elektrophoretisch nicht aufgetrennt werden und bildete einen „Schmier“, der sich über die gesamte Bahn im Gel erstreckte. Im Zuge dessen wurde das rekombinante CoxF mittels Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation auf das Vorkommen von Oligomeren und zur Ermittlung der zugehörigen Molekulargewichte analysiert (Martin und Ames 1961) (Abb. 3-45). Um einen Einfluss des verwendeten Puffersystems zu untersuchen, wurde die Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation sowohl in 100 mM Tris/Acetat pH 8,0 (A) als auch in 20 mM Tris/HCl pH 8,0 (C) durchgeführt. In beiden Fällen wurde dabei der nach Solubilisierung der Einschlusskörper und Rückfaltung von CoxF (Kap. 3.23) eingestellte pH-Wert beibehalten. Als Referenz zur Größenbestimmung diente jeweils ein unter identischen Bedingungen mitgeführter Gradient mit aufgereinigter CO-Dehydrogenase als Marker (B bzw. D). Diese besitzt ein Molekulargewicht von 277 kDa und einen Sedimentationskoeffizienten $S_{20,w}$ von 10,78 (Meyer 1978).

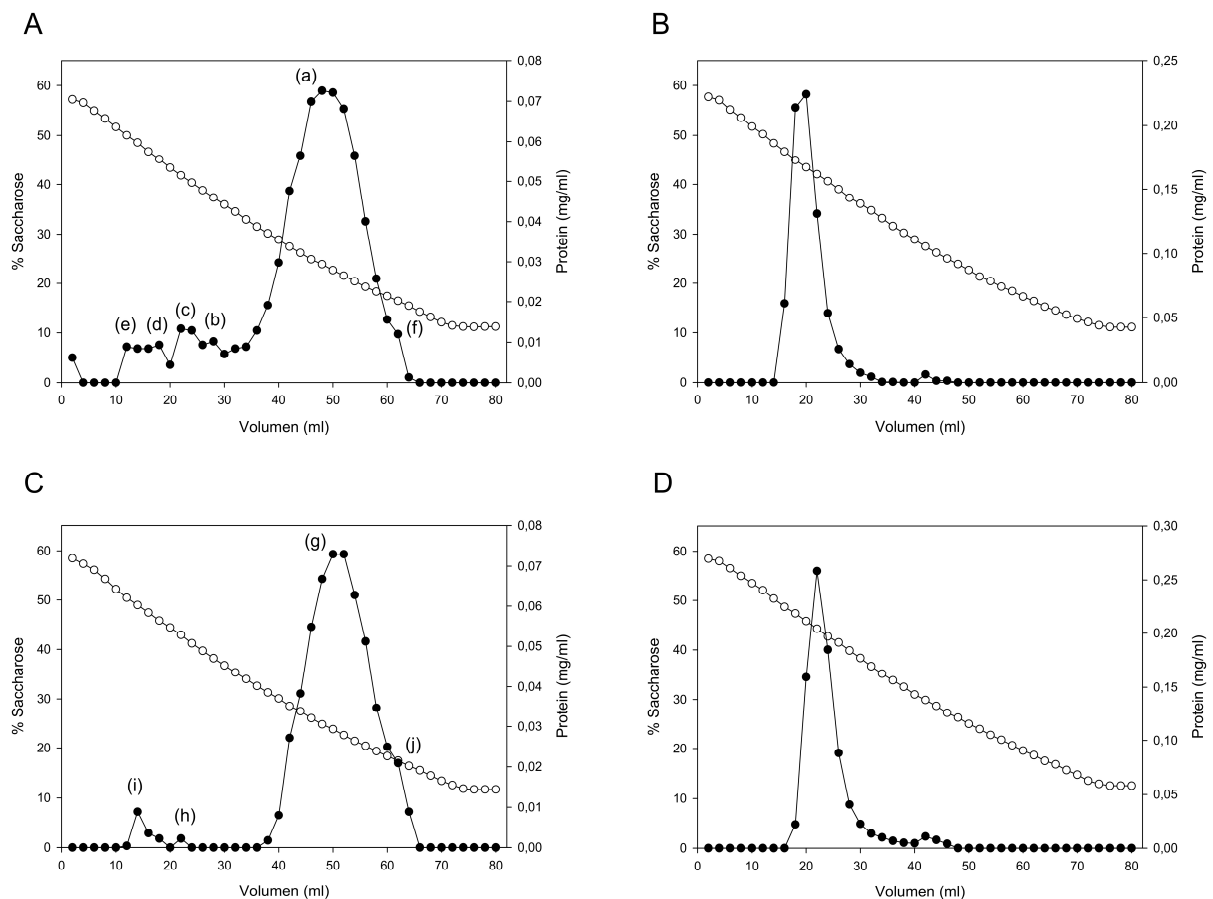


Abbildung 3-45: Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation von rekombinantem, rückgefaltetem CoxF.

Rekombinantes, rückgefaltetes CoxF (2,8 mg) wurde auf einen Saccharosedichtegradienten mit 5 - 55 % (w/v) Saccharose in 20 mM Tris/HCl pH 8,0 (A) bzw. 100 mM Tris/Acetat pH 8,0 (C) aufgeschichtet. Jeder Gradient hatte ein Gesamtvolumen von 84 ml. Als Referenz wurde ein Gradient mit aufgereinigter CO-Dehydrogenase (2,8 mg) im jeweils gleichen Puffersystem mitgeführt (B bzw. D). Die Ultrazentrifugation wurde bei 100.000 x g, 63 h und 4 °C durchgeführt. Anschließend wurden die Gradienten zu Fraktionen mit je 2 ml abgepumpt und in jeder Fraktion die Saccharosekonzentration (○) refraktometrisch bestimmt (Kap. 2.25.1) sowie die Proteinkonzentration (●) ermittelt (Kap. 2.16).

Im Tris/HCl-Gradienten konnte das rekombinante CoxF-Protein in einem Dichtebereich von 51,72 % bis 14,21 % (w/v) Saccharose detektiert werden (Abb. 3-45, A). Ein Hauptpeak (a) konnte bei 23,89 % (w/v) Saccharose ausgemacht werden. Die CO-Dehydrogenase wurde im analog behandelten Referenzgradienten bei 34,70 bis 46,70 % (w/v) Saccharose detektiert (Abb. 3-45, B). Aus deren Wanderungsverhalten im Saccharosedichtegradienten konnte berechnet werden, dass CoxF in einem molekularen Massenbereich von 51,9 bis 360,6 kDa vorkommt. Der Hauptpeak entspricht einer molekularen Masse von 113,21 kDa (a), die kleineren Peaks (b, c, d, e) den Massen 220,9, 262,3, 294,1 bzw. 343,0 kDa. Zudem zeigt sich eine Schulter (f) mit einer molekularen Masse von 64,4 kDa. Auf Grundlage der aus der Sequenz von CoxF abgeleiteten molekularen Masse von 29,346 kDa können die detektierten Maxima 4-meren (a), 8-meren (b), 9-meren (c), 10-meren (d) und 12-meren (e) zugeordnet werden. Die Schulter (f) entspricht einem 2-mer.

Ein ähnliches Proteinprofil ergab sich für den Tris/Acetat-Gradienten mit rekombinantem CoxF (Abb. 3-45, C). Hier konnte CoxF in einem Dichtebereich von 14,21 bis 50,02 % (w/v) Saccharose detektiert werden. CoxF verteilte sich dabei auf eine Schulter und drei Maxima, der Hauptpeak (g) lag bei 23,82 % (w/v) Saccharose. Im entsprechenden Referenzgradienten wurde die CO-Dehydrogenase bei 41,83 % (w/v) Saccharose ermittelt. Nach Schachmann (1959) können den CoxF-Maxima Molekulargewichten von 119,0 kDa (g), 277,0 kDa (h) und 346,3 kDa (i) zugeordnet werden, was als 4-mer (g), 9-mer (h) und 12-mer (i) zu interpretieren ist. Die Schulter (j) mit einem Molekulargewicht von 73,36 kDa ist als 2-mer zu werten.

In beiden Puffersystemen kommt CoxF somit überwiegend als 4-mer vor. Dies scheint die Hauptform des rekombinanten CoxF-Proteins aus Einschlusskörpern darzustellen. Berücksichtigt man die Proteinkonzentrationen in den verschiedenen Peaks, so zeigt sich, dass das 2-mer jeweils die kleinste Organisationsstufe darstellt. Im Tris/HCl-Gradienten

treten 2-mer und 4-mer im Verhältnis 1 : 3 auf (Tab. 3-19), der Anteil weiterer, höherer Oligomere kann als vernachlässigbar gering eingestuft werden. Im Tris/Acetat-Gradienten beträgt das Verhältnis von 2-mer und 4-mer 1 : 1,75, also annähernd 1 : 2. Auch hier kann das Auftreten höherer oligomerer Strukturen als vernachlässigbar angesehen werden.

Tabelle 3-19: Oligomere von CoxF in Saccharosedichtegradienten-Zentrifugationen.

Rekombinantes CoxF wurde Saccharosedichtegradienten-Zentrifugationen in 20 mM Tris/HCl pH 8,0 (Abb. 3-45, A) bzw. 100 mM Tris/Acetat pH 8,0 (Abb. 3-45, C) unterzogen und das Proteinprofil im Hinblick auf das Auftreten von oligomeren Strukturen untersucht. Mithilfe von Referenzgradienten (Abb. 3-45, B bzw. D) konnten nach Schachmann (1959) die molekularen Massen der Proteinpeaks und Schultern ermittelt und somit die oligomere Organisation von CoxF bestimmt werden. Angegeben sind für die jeweiligen Gradienten die entsprechenden Proteinpeaks im Profil sowie der ermittelte Oligomerisierungsgrad, die Proteinkonzentration sowie das Verhältnis der verschiedenen Oligomere zum 2-mer.

Tris/HCl-Gradient				Tris/Acetat-Gradient			
Peak	Oligomer x-fach CoxF	Proteinkonz. (µg/ml)	Verhältnis zum 2-mer	Peak	Oligomer x-fach CoxF	Proteinkonz. (µg/ml)	Verhältnis zum 2-mer
(f)	2-mer	12,0	1,0	(j)	2-mer	20,9	1,0
(a)	4-mer	72,6	3,0	(g)	4-mer	73,0	1,75
(b)	8-mer	10,2	0,21	(h)	9-mer	2,2	0,02
(c)	9-mer	12,9	0,24	(i)	12-mer	8,9	0,07
(d)	10-mer	9,3	0,16				
(e)	12-mer	8,9	0,12				

Um die oligomere Organisation von CoxF zu bestätigen, wurden zudem transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen in Kooperation mit Dr. Thorsten Mielke und Jörg Bürger am Max Planck Institut für molekulare Genetik (Ihnestraße 73, 14195 Berlin, Deutschland) in der Abteilung für Mikroskopie erstellt (Kap. 2.34). Die CoxF-Präparate wurden hierzu mit Uranylacetat negativ kontrastiert. Auf den Abbildungen konnten CoxF-Partikel erkannt werden, die in einer Größenordnung von 6 bis 29 nm lagen und klar von unspezifischen Aggregaten abgegrenzt werden konnten (Abb. 3-46). Die meisten Partikel lagen in einem Größenbereich von 11 bis 13 nm (rote bzw. grüne Kästen), so dass auch hier eine dominierende Spezies vorlag. Es konnten aber auch kleinere Strukturen (blaue Kästen) mit einer Größe von 6 - 7 nm aufgefunden werden.

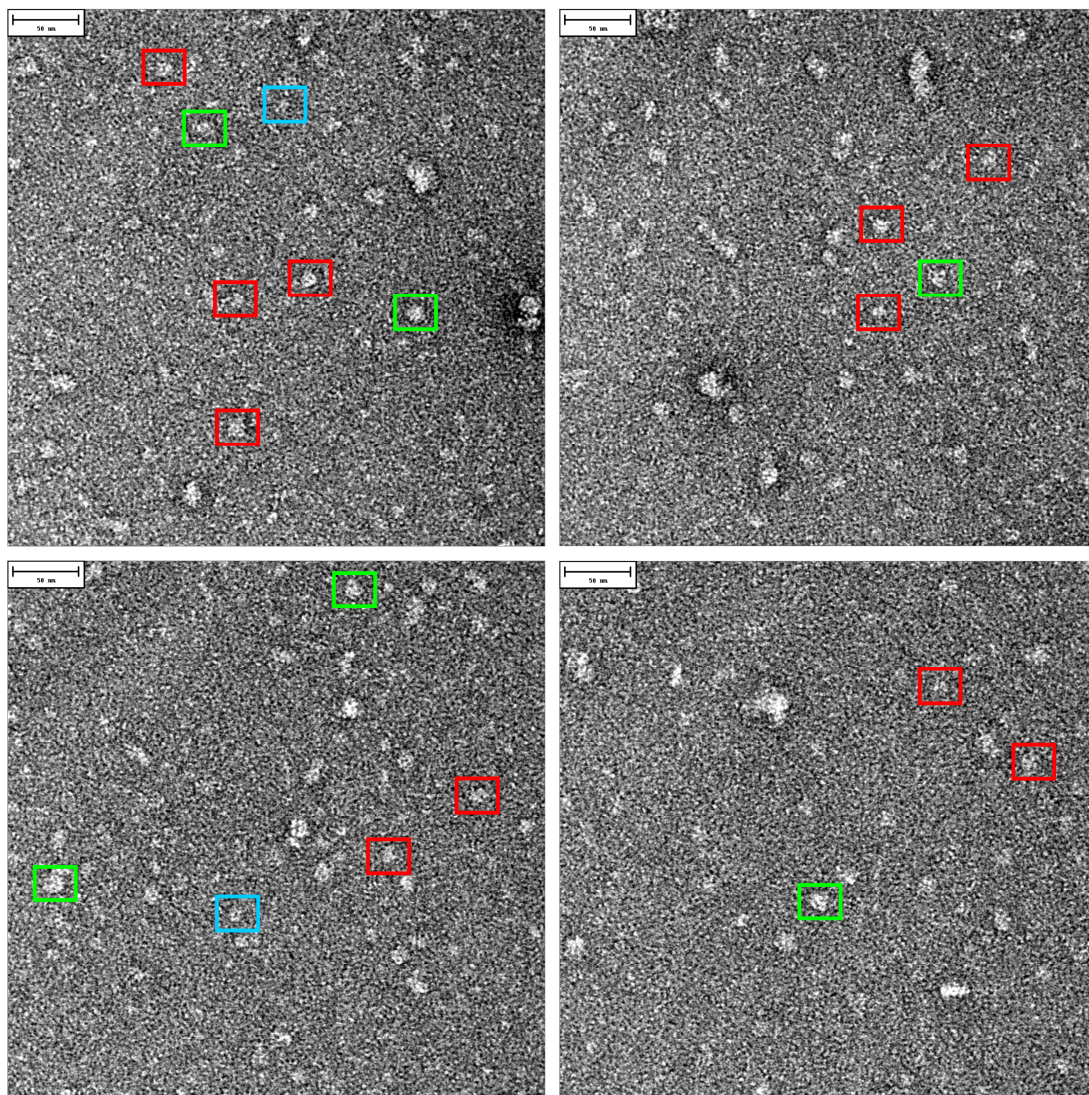


Abbildung 3-46: Transmissionselektronenmikroskopische (TEM-) Aufnahmen von rekombinantem, rückgefaltetem CoxF.

Rekombinantes, rückgefaltetes CoxF-Protein aus Einschlusskörpern (72 µg/ml in 20 mM Tris/HCl pH 8,0) wurde mit 2 % (w/v) Uranylacetat negativ kontrastiert und Abbildungen mittels Transmissionselektronenmikroskopie erstellt. Der Maßstabsbalken entspricht 50 nm. CoxF zeigt verschiedene oligomere Strukturen, welche exemplarisch markiert sind. Partikel mit einem Durchmesser von 6 - 7 nm sind blau markiert, in rot und grün sind Strukturen mit einem Durchmesser von 11 bzw. 13 nm hervorgehoben.

3.26 Rekombinantes, löslich gebildetes CoxF aus *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 liegt in verschiedenen oligomeren Zuständen vor und lässt sich partiell anreichern

Denaturierende PAGE cytoplasmatischer Fraktionen von *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 zeigten, dass CoxF zu einem Anteil von 20,1 % löslich gebildet wird (vgl. Kap. 3.4, Abb. 3-5). Die Identität des löslich gebildeten Polypeptids konnte zuvor mittels N-terminaler Sequenzierung bestätigt werden. Hierzu wurde das Cytoplasma wie unter Kap. 2.19 erläutert, einer zweimaligen denaturierenden PAGE unterzogen und die aufgetrennten Proteine schließlich mittels Western-Blotting auf eine PVDF-Membran transferiert. Die vermeintliche CoxF-Bande wurde ausgeschnitten und die Sequenz der ersten zehn N-terminalen Aminosäuren (M¹TPTPDVLDL¹⁰) durch die Firma SEQLAB (Sequence Laboratories Göttingen GmbH, Göttingen, Deutschland) bestätigt.

Versuche, das lösliche Protein aufzureinigen, waren jedoch nicht erfolgreich. So wurde versucht, unter Berücksichtigung des theoretischen, aus der Aminosäure-Sequenz berechneten isoelektrischen Punktes (pI), CoxF mittels Anionenaustauschchromatographie anzureichern. Um eine Bindung des Proteins an die Gelmatrix zu ermöglichen, wurde hierzu das Säulenmaterial auf einen pH-Wert von 7,2 äquilibriert. Nach Probenauftrag konnte der überwiegende Anteil von CoxF im Profil des Säulenlaufs im Durchfluss der ungebundenen Proteine ermittelt werden, nur ein äußerst geringer Anteil konnte unter den gegebenen Bedingungen an die Säulenmatrix binden. Der Nachweis erfolgte jeweils über denaturierende PAGE der jeweiligen Fraktionen und Immunoblot mit spezifischen Anti-CoxF-IgG-Antikörpern. Die Fraktionen, in denen CoxF detektiert wurde, konnten zwar vereinigt werden, jedoch zeigte sich ein rasches Ausfallen des Proteins unmittelbar nach Passage der Säule. Der gleiche Sachverhalt zeigte sich auch für eine unter identischen Bedingungen durchgeführte Kationenaustauschchromatographie (Cellulose CM32, GE Healthcare). Für eine Teilanreicherung von CoxF wurde zudem versucht, das CoxF-Protein mit Ammoniumsulfat auszufällen. Fraktionierte Fällungen zeigten dabei, dass CoxF bei 25 - 30 % Sättigung mit Ammoniumsulfat ausgefällt werden kann. Obwohl es sich bei der Ammoniumsulfatfällung um eine reversible Fällungsmethode handelt (Isenberg 1995; Jiang et al. 2004), konnte das Protein im Anschluss nicht wieder in Lösung gebracht werden. Es konnte daher davon ausgegangen werden, dass sich das rekombinante CoxF-Protein durch eine hohe Instabilität auszeichnet.

Wie bereits erwähnt, zeigten die PAGE-Analysen, dass das rekombinante CoxF unter der Vielzahl weiterer cytoplasmatischer Proteine mit 20,1 % den Hauptanteil darstellt

(Kap. 3.4). Daher wurde für eine Teilanreicherung des löslichen CoxF eine Gelfiltration durchgeführt (Kap. 2.14.2). Dabei sollte anhand des Proteinprofils zum einen festgestellt werden, ob auch das löslich exprimierte CoxF verschiedene oligomere Formen ausbildet und zum anderen sollten die Proteinpeaks des Profils mittels denaturierender PAGE und Immunoblot auf die Reinheit des vorliegenden CoxF-Proteins analysiert werden.

Die cytoplasmatische Fraktion von induziert gewachsenem *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 konnte nach Abernten und Zellaufschluss mittels Ultrazentrifugation gewonnen werden (Kap. 2.8 und 2.11). Ein entsprechendes Volumen dieses Cytoplasmas wurde auf eine HiPrep Sephacryl S-400 Gelfiltrationssäule aufgetragen. Da rekombinantes CoxF aus Einschlusskörpern nach Solubilisierung und Rückfaltung in Form verschiedener oligomerer Zustände vorlag, welche von 4-meren bis hin zu 12-meren reichten (Kap. 3-25), wurde für die Gelfiltration des löslichen CoxF ein Säulenmaterial ausgewählt, welches einen Trennbereich von 2×10^4 bis 8×10^6 Da aufwies (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Hersteller-Information). In dieser Matrix sollten somit sämtliche, eventuell vorkommende Oligomere inkludiert werden. Zudem sollte der relativ weite Molekulargewichtsbereich eine gute Trennung der Zustände ermöglichen.

Das Profil der Gelfiltration (Abb. 3-47, A) zeigte, dass sich das Protein (●) im Wesentlichen auf fünf Bereiche bzw. Peaks aufteilt. Ein geringes Volumen einer jeden Fraktion des Säulenlaufs wurde einer denaturierenden PAGE unterzogen und CoxF mittels Immunoblot mit spezifischen IgG-Antikörpern nachgewiesen (○). Dabei zeigte sich, dass CoxF in nahezu allen Proteinpeaks vorhanden war, was das Vorkommen unterschiedlicher oligomerer Zustände bestätigt. Um Aussagen über die Größe dieser Oligomere treffen zu können, wurde ein Säulenlauf mit Markerproteinen unter identischen Bedingungen durchgeführt (Kap. 2.14.2). Anhand der dabei auftretenden Proteinpeaks und der bekannten molekularen Massen der Markerproteine konnte eine Regressionsgerade erstellt werden, die eine Berechnung der Größen und damit der oligomeren Zustände des rekombinanten CoxF-Proteins ermöglichte. Tab. 3-20 gibt einen Überblick über die verschiedenen oligomeren Zustände und deren molekularen Massen.

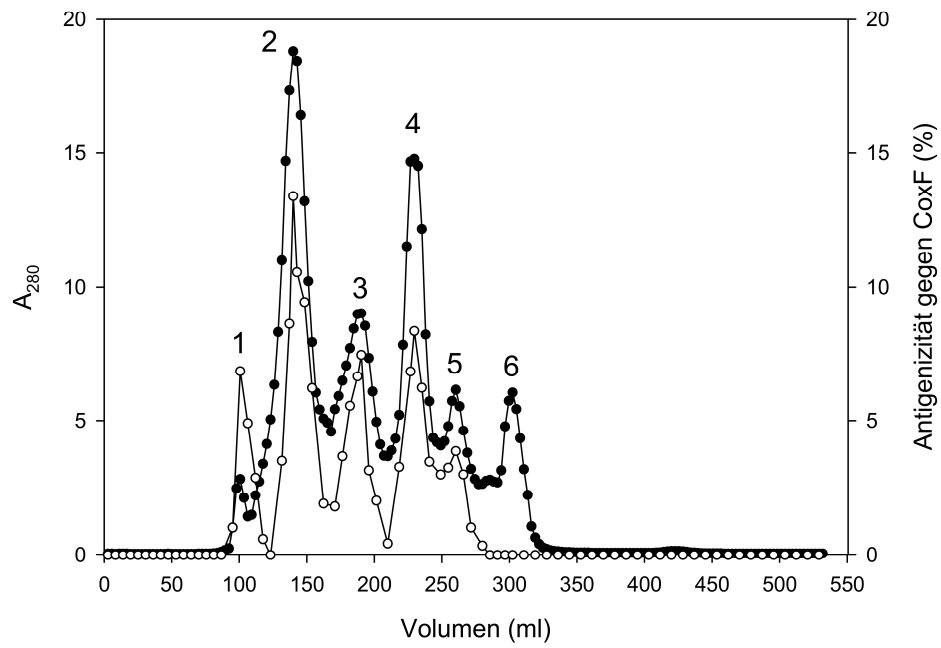
Tabelle 3-20: Elutionsvolumina und berechnete molekulare Massen des rekombinanten CoxF-Proteins bzw. dessen Oligomere nach Gelfiltration an einer HiPrep Sephacryl S-400 Säule.

Für die verschiedenen Peaks im Proteinprofil wurden die Elutionsvolumina ermittelt und CoxF in den jeweiligen Fraktionen mittels PAGE und nachfolgendem Immunoblot über spezifische IgG-Antikörper detektiert (Kap. 2.17, 2.18 und 2.22). Die Bestimmung der stokeschen Radien der CoxF-Oligomere erfolgte über eine Eichgerade mit Markerproteinen bekannter Größe (vgl. Kap. 2.14.2).

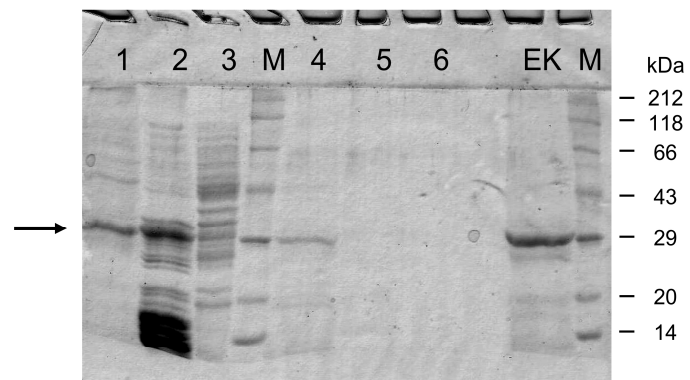
Peak	Elutionsvolumen (ml)	molekulare Masse (kDa)	x-fach CoxF
1	105,8	518,6	17,6
2	150,0	361,6	12,3
3	200,0	184,1	6,35
4	244,1	27,05	0,92
5	261,8	18,2	0,62 (Abbauprodukt)

Die Gelfiltration des Cytoplasmas von *E. coli* A494(DE3)/pSL1 zeigt, dass CoxF als Monomer (Elutionsvolumen 244,1 ml) als auch in verschiedenen oligomeren Zuständen vorliegt, deren Grundlage das 6-mer ist. So werden bei Elutionsvolumina von 200,0 ml das 6-mer, bei 150,0 ml das 12-mer und bei 105,8 ml das 18-mer eluiert. Mittels denaturierender PAGE wurde die Reinheit des CoxF-Proteins in den verschiedenen Proteinpeaks des Gelfiltrationslaufs überprüft (Abb. 3-47, B und C). Dabei zeigte sich, dass Peakfraktion 4 das CoxF-Protein mit einer Reinheit von 70,5 % enthält. Hierbei handelt es sich um das CoxF-Monomer.

A



B



C

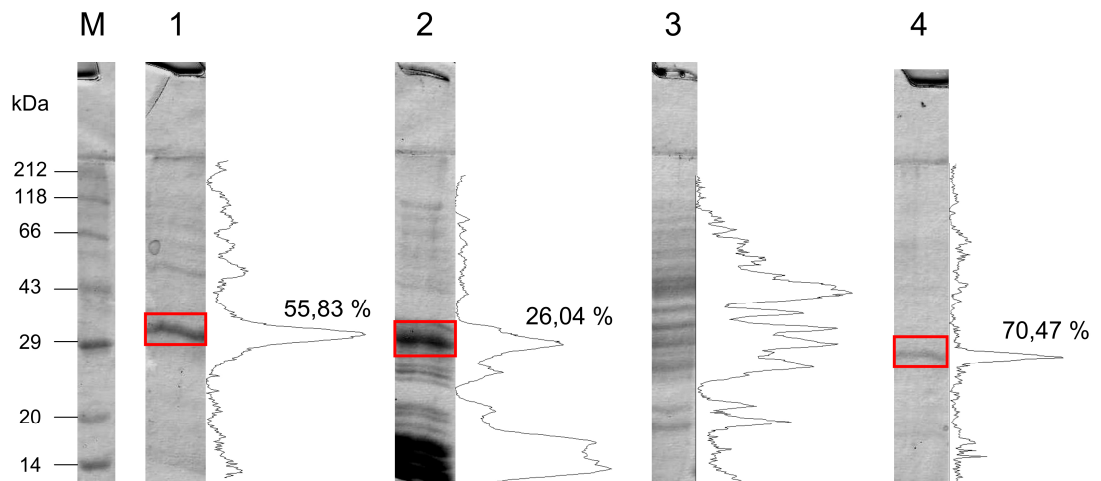


Abbildung 3-47: Anreicherung von heterolog exprimiertem, löslichem CoxF (aus der cytoplasmatischen Fraktion von *E. coli* AD494(DE3)/pSL1) mittels Gelfiltration an einer S-400 Sephacryl Säule.

Zellmaterial von IPTG-induziertem *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 wurde aufgeschlossen und der erhaltene Rohextrakt einer Ultrazentrifugation unterzogen (Kap. 2.11). 10 ml (360,4 mg) des gewonnenen Cytoplasmas (36,04 mg/ml) wurden auf eine HiPrep Sephacryl S-400 Gelfiltrationssäule aufgetragen und die enthaltenen Proteine und Proteinkomplexe gemäß ihrer Stokes'schen Radien getrennt. Das Bettvolumen der Säule betrug 245 ml, die Säule wurde zuvor mit 500 ml 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 äquilibriert. Über den gesamten Verlauf der Gelfiltration wurde der relative Proteingehalt anhand der Absorption bei 280 nm verfolgt (A, ●). Die jeweiligen Fraktionen (2,8 ml) wurden des Weiteren einer denaturierenden PAGE mit anschließendem Immunoblot unterzogen. Mittels spezifischer Anti-CoxF-Immunglobulin G - Antikörper konnte das Vorhandensein von CoxF in den Fraktionen bzw. dessen relativer Gehalt ermittelt werden (A, ○). Um eine Aussage über die Reinheit des CoxF-Proteins zu erhalten, wurden zusätzlich die Peak-Fraktionen eines jeden Proteinpeaks einer denaturierenden PAGE unterzogen (B, C). Die Bahnen sind dabei den verschiedenen Peaks im Proteinprofil zugeordnet. Als Referenz wurde zusätzlich zum Protein-Standard (B und C, Bahn „M“; Roti-Mark Standard, Roth, Karlsruhe, Deutschland) rekombinantes CoxF aus Einschlusskörpern (B, Bahn „EK“) mit-aufgetragen. Das Gel wurde mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt und der Gehalt von CoxF in den jeweiligen Fraktionen videodensitometrisch bestimmt (C).

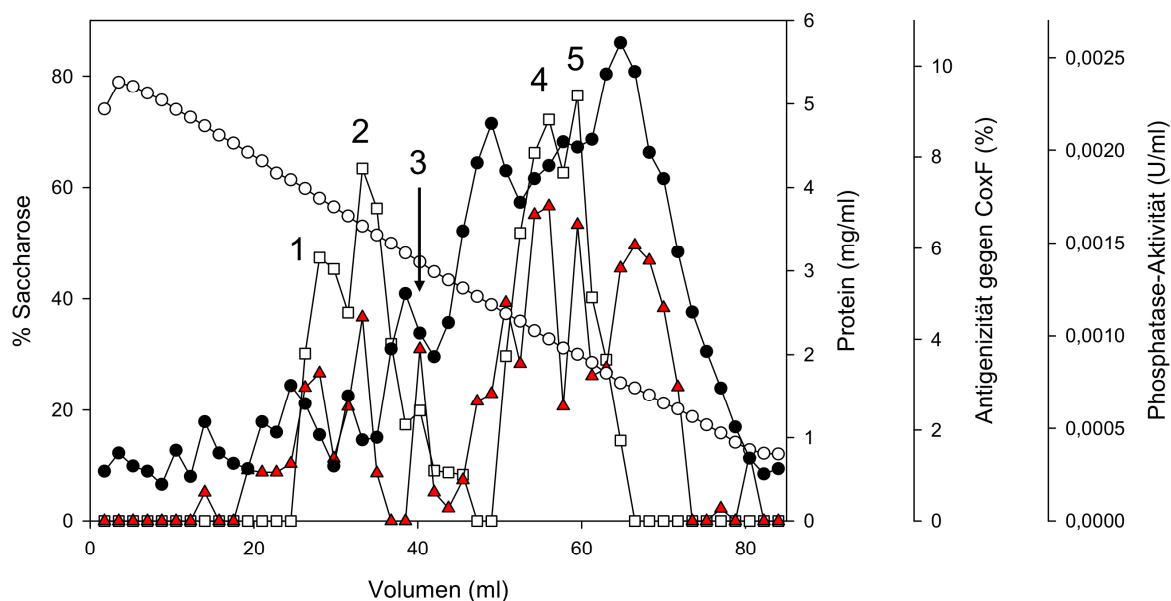
3.27 CoxF zeigt Hinweise auf eine vorhandene Phosphatase-Aktivität

Die bioinformatisch mittels SABLE (Kap. 3.1) vorhergesagten Schlüsselemente auf der Sequenz von CoxF zeigen, dass das Polypeptid ein für Histidin-Phytsen charakteristisches Motiv am C-Terminus trägt. Bei Phytsen handelt es sich um eine Unterklasse von Phosphatasen, deren Phosphoryl-Transfer-Reaktionen über Phosphohistidin-Intermediate ablaufen (van Etten 1982). Die Hydrolyse eines weiten Spektrums an Orthophosphat-Monoestern als auch Phosphat-Transfer-Reaktionen wird katalysiert (Lam und Yam 1977). In dem von Hillmann (1971) etablierten Assay wird die Aktivität durch Hydrolyse von 1-Naphthyl-Phosphat nachgewiesen. Das dabei freigesetzte Naphthol bildet im sauren Milieu mit Fast Red TR - Salz einen roten Farbstoff, der mittels Absorptionsmessung bei 410 nm nachgewiesen werden kann (vgl. Kap. 2.24.3).

Da homologes CoxF nicht in der für einen Aktivitätstest notwendigen Reinheit vorlag, wurde die cytoplasmatische Fraktion des Wildtyps von *O. carboxidovorans* OM5 (in welcher CoxF nachgewiesen werden konnte; Kap. 3.8, Abb. 3-9, C) einer Saccharose-dichtegradienten-Zentrifugation unterzogen (Kap. 2.25) und das CoxF-Polypeptid mittels spezifischer IgG-Antikörper nachgewiesen (Kap. 2.22). Sämtliche Fraktionen des Gradienten

wurden hinsichtlich einer eventuell vorhandenen Phosphatase-Aktivität getestet (Kap. 2.24.3). Dabei ergaben sich Koinzidenzen mit den für CoxF erhaltenen immunologischen Signalen (Abb. 3-48, A). Als Referenz diente ein Saccharosedichtegradient mit Cytoplasma aus der *coxF*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 (Abb. 3-48, B). Hier konnte kein CoxF detektiert werden (vgl. auch Kap. 3.7; Abb. 3-8, C und Kap. 3.9, Abb. 3-16, B). Die koinzidierenden Peaks im Profil der Phosphatase-Aktivität waren ebenfalls nicht vorhanden.

A



B

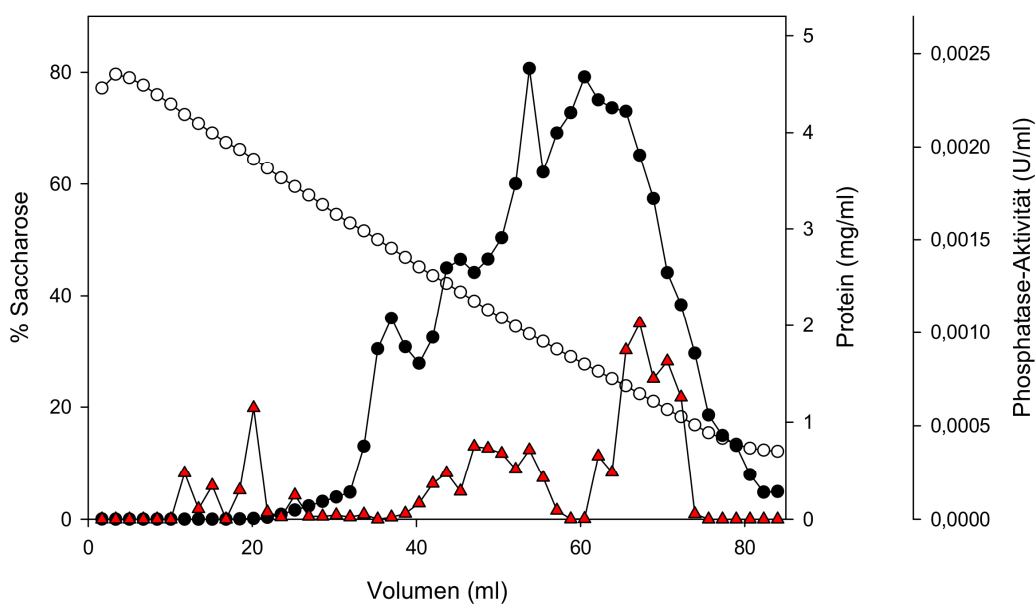


Abbildung 3-48: Aktivität saurer Phosphatasen in Saccharosedichtegradienten der cytoplasmatischen Fraktion aus dem Wildtyp und der *coxF*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5.

Cytoplasma des Wildtyps (A) und aus der *coxF*-Mutante (B) aus *O. carboxidovorans* OM5 wurden Saccharosedichtegradienten-Zentrifugationen unterzogen (Kap. 2.25.1). Für jede Fraktion wurde der Saccharosegehalt (○) und die Proteinkonzentration (●) (Kap. 2.16) ermittelt. CoxF (□) wurde über SDS-PAGE der einzelnen Fraktionen (Kap. 2.17) und anschließenden Immunoblot mit densitometrischer Auswertung der PVDF-Membranen detektiert (Kap. 2.18, 2.22 und 2.23). Zusätzlich wurde in jeder Fraktion die Phosphatase-Aktivität bestimmt (▲) (Kap. 2.24.3).

Für *O. carboxidovorans* OM5 kann mittels des UniProt-Servers (Kap. 2.35) eine Reihe von (potenziellen) Phosphatasen oder Phosphatase-ähnliche Proteinen ermittelt werden, welche in Tab. 3-21 aufgelistet sind. Phosphatasen, die als membrangebunden charakterisiert wurden, sind nicht aufgeführt. Offen bleibt, welche dieser Polypeptide unter den gewählten Bedingungen des Phosphatase-Assays (Kap. 2.24.3) eine Aktivität zeigt. Diese Frage stellt sich v.a. für die vier identifizierten Protein-Tyrosin-Phosphatasen, zu denen nach Veeramani et al. (2009) auch Histidin-abhängige saure Phosphatasen gezählt werden können. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte in Abwesenheit von L-(+)-Tartrat, welches als Inhibitor der Phosphatase-Aktivität fungieren kann.

Tabelle 3-21: Phosphatasen und Phosphatase-ähnliche Proteine aus *O. carboxidovorans* OM5.

Die Auflistung wurde mithilfe des UniProt-Servers (Kap. 2.35) erstellt. Membrangebundene Polypeptide wurden nicht berücksichtigt.

Protein-Name	Gen	Anzahl Aminosäuren
5'-Nukleotidase SurE (EC 3.1.3.5) (Nukleosid 5'-monophosphat phosphohydrolase)	surE OCA5_6263 OCA5_c17690	258
Error-prone DNA Polymerase (EC 2.7.7.7)	dnaE2 OCA5_c27920 OCA5_5176	1107
Inositol-1-monophosphatase (IMPase) (EC 3.1.3.25)	suhB OCA5_c08010 OCA5_7316	262
Protein-Tyrosin-Phosphatase (Transcriptional regulator, ArsR family)	OCA5_pOC16700690 OCA5_7747	175
Exodesoxyribonuklease III (EC 3.1.11.2)	xthA1 OCA5_c01720 OCA5_4357	271
D,D-heptose 1,7-bisphosphat Phosphatase (EC 3.1.3.-)	gmhB OCA5_c26450 OCA5_5331	177
Inositol monophosphatase family protein (EC 3.1.3.25)	OCA5_c30090 OCA5_4947	260
Phosphonoacetat Hydrolase (EC 3.11.1.2)	phnA OCA5_c12270 OCA5_6851	418
Protein-Tyrosin-Phosphatase	OCA5_c02840 OCA5_4232	175
Exopolyphosphatase family protein (Ppx/GppA phosphatase)	OCA5_c17020 OCA5_6338	480
Metallophosphoesterase (Putative serine/threonine-protein phosphatase)	OCA5_c19110 OCA5_6117	245
Low molecular weight Protein-Tyrosin- Phosphatase	OCA5_c32180 OCA5_4732	155
Phosphoglycerat Mutase (Putative phosphohistidine phosphatase)	OCA5_c26120 OCA5_5366	176
Phosphoglycolat Phosphatase Gph (EC 3.1.3.18)	gph OCA5_c15300 OCA5_6530	225
DNA Polymerase III Untereinheit alpha (EC 2.7.7.7)	dnaE1 OCA5_c20700 OCA5_5953	1157
Low molecular weight Phospho-Tyrosin- Protein-Phosphatase	OCA5_c04770 OCA5_4030	180
Fruktose-1,6-bisphosphatase	glpX OCA5_c20090 OCA5_6017	331
Trehalose 6-phosphat Phosphatase (EC 3.1.3.12)	otsB OCA5_c33310 OCA5_4613	265
Exodesoxyribonuklease III (EC 3.1.11.2)	xth xthA2 OCA5_c17560 OCA5_6276	260
Phosphoserin Phosphatase SerB (EC 3.1.3.3)	serB OCA5_c26900 OCA5_5282	297
DNA Polymerase III alpha chain	dnaA OCA5_pHCG300260	140
Fruktose-1,6-bisphosphatase class 1 (EC 3.1.3.11)	cbbF fbp OCA5_pHCG300410	345
Phosphoglycolat Phosphatase Gph (EC 3.1.3.18)	gph OCA5_pHCG300510	237
Nicht-charakterisiertes Protein	OCA5_6935	169
Nicht-charakterisiertes Protein	OCA5_c11470	168
Ppx/GppA Phosphatase	OCA5_6473	333
Phosphatase, Ppx/GppA family protein	OCA5_c15790	349

Der Vergleich der Profile der Phosphatase-Aktivität (Abb. 3-48, ▲) und der immunologischen Detektion von CoxF (Abb. 3-48, □) zeigt im Wildtyp-Gradienten eine ausgeprägte Koinzidenz. So kann für die verschiedenen oligomeren Strukturen von CoxF, dem 16-mer (Peak 1), dem 14-mer (Peak 2), dem 12-mer (Peak 3), dem 7-mer (Peak 4) und dem 6-mer (Peak 5) (vgl. Kap. 3.9) eine deutliche Phosphatase-Aktivität ermittelt werden. Diese deutet damit auf eine entsprechende Aktivität des CoxF-Polypeptids hin, da entsprechende Aktivitätsmaxima im Profil des Gradienten der *coxF*-Mutante fehlen (Abb. 3-48, B). Die hier gemessene, verbleibende Aktivität ist somit auf Proteine zurückzuführen, die ebenfalls in der Lage sind, 1-Naphthyl-Phosphat zu hydrolysieren.

Heterologes CoxF konnte aus Einschlusskörpern von *E.coli* AD494(DE3)/pSL1 effektiv angereichert sowie solubilisiert und rückgefaltet werden (vgl. Kap. 3.22 und 3.23). Das Polypeptid lag nach Rückfaltung mit einer hohen Reinheit von 91 % vor (Abb. 3-43, Tab. 3-17). Die Bestimmung einer Orthophosphat-Monoester-hydrolysierenden Aktivität war jedoch nicht möglich. Nach Zugabe von CoxF zum Fast-Red-TR-Puffer (vgl. Kap. 2.24.3) kam es innerhalb weniger Minuten zur Ausbildung unlöslicher Präzipitate. Ausgefallenes Protein konnte zwar nach Zentrifugation abgetrennt werden, in dem erhaltenen Überstand war jedoch keine Phosphatase-Aktivität nachweisbar. Auch eine Modifizierung des Assays, bei der die Reaktion durch Zugabe von CoxF gestartet wurde, führte zu keinen brauchbaren Ergebnissen. Die Instabilität des heterolog exprimierten Polypeptids erlaubte somit keine Aussage über eine mögliche Aktivität. Ursache hierfür könnte eine unvollständige oder fehlerhafte Faltung sein, wodurch sich auch die starken Abweichungen der über CD-Spektroskopie ermittelten Sekundärstruktur-Elemente von der SABLE-Vorhersage erklären ließen (vgl. Kap. 3.24).

Ein Teil des rekombinant gebildeten CoxF in *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 lag löslich im Cytoplasma vor (vgl. Kap. 3.4, Abb. 3-5 und Kap. 3.26). Wie auch das rückgefaltete CoxF aus Einschlusskörpern zeigte auch das lösliche CoxF-Polypeptid eine hohe Instabilität, wodurch eine Aufreinigung mittels säulenchromatographischer Trennverfahren nicht möglich war. Dennoch konnte das Cytoplasma über Gelfiltrationen aufgetrennt werden und CoxF mittels spezifischer IgG-Antikörper in Form verschiedener oligomerer Strukturen detektiert werden (Kap. 3.26, Abb. 3-47, Tab. 3-20). Die Fraktionen des Gelfiltrationslaufs wurden in analoger Weise auf Phosphatase-Aktivität analysiert. Dabei zeigte sich eine Koinzidenz mit der immunologischen Detektion von CoxF (Abb. 3-49).

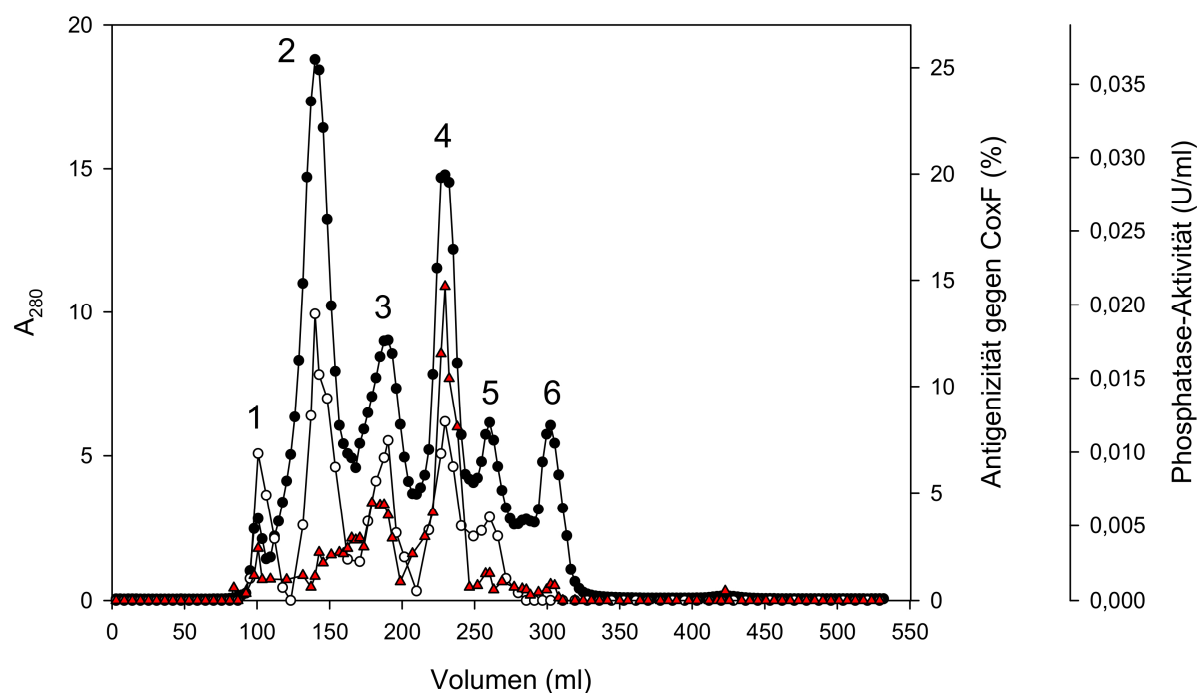


Abbildung 3-49: Trennung von CoxF - Oligomeren (in der cytoplasmatischen Fraktion von *E. coli* AD494(DE3)/pSL1) mittels Gelfiltration und koinzidierende Phosphatase-Aktivität.

Cytoplasma (10 ml mit 36,04 mg/ml) von induziert angezüchtetem *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 wurde mittels Gelfiltration an einer HiPrep Sephacryl S-400 Säule aufgetrennt. Das Bettvolumen der Säule betrug 245 ml, die Säule wurde zuvor mit 500 ml 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2 äquilibriert. Über den gesamten Verlauf der Gelfiltration wurde der relative Proteingehalt anhand der Absorption bei 280 nm verfolgt (●). Die jeweiligen Fraktionen (2,8 ml) wurden einer denaturierenden PAGE mit anschließendem Immunoblot unterzogen und CoxF mittels spezifischer IgG-Antikörper detektiert (○). Desweiteren wurde die Phosphatase-Aktivität in jeder Fraktion bestimmt (▲).

CoxF konnte im Rahmen der Gelfiltration als Monomer als auch in Form verschiedener oligomerer Strukturen detektiert werden (Abb. 3-47 und 3-49, A, Peaks 1-4). Für ersteres konnte dabei die höchste Aktivität detektiert werden. In der entsprechenden Peak-Fraktion (Peak 4) lag CoxF mit einer Reinheit von 70,47 % vor. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich im Anteil des kontaminierenden Fremdproteins Polypeptide befanden, die ebenso Phosphomonoester-hydrolysierende Aktivität besitzen. So konnten über den UniProt-Server (Kap. 2.35) für den Stamm *E. coli* AD30 beispielsweise 48 Phosphatasen oder Phosphatase-ähnliche Protein ermittelt werden, die als nicht-membrangebunden charakterisiert oder vorhergesagt wurden. Dennoch gibt der hohe Anteil von CoxF in dieser Peak-Fraktion einen deutlichen Hinweis auf vorhandene Phosphatase-Aktivität.

4 Diskussion

4.1 Die Sequenzen der Genprodukte *coxDEF* und prognostizierte Funktionen der resultierenden Polypeptide

Der Subcluster *coxDEFG* auf dem Megaplasmid pHCG3 liegt stromabwärts der Strukturgene *coxMSL*, welche für die Untereinheiten der CO-Dehydrogenase kodieren. Die Genprodukte von *coxD*, *coxE* und *coxF* spielen nach bisherigem Stand eine essentielle Rolle bei der posttranslationalen Reifung des [CuSMoO₂] - Clusters von CO-Dehydrogenase (Santiago et al. 1999; Meyer et al. 2000; Fuhrmann et al. 2003; Gnida et al. 2003).

CoxD wird dabei eine Funktion bei der Inkorporation des Schwefels zugeschrieben (Pelzmann et al. 2009; Maisel et al. 2012). BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool) - Analysen der Aminosäuresequenz von CoxD zeigten signifikante Sequenzhomologien zur P-loop NTPase - Superfamilie und eine konservierte AAA+-Domäne. Darüber hinaus kann CoxD der orthologen Gruppe COG0714, den MoxR-artigen ATPasen, zugeordnet werden (Pelzmann et al. 2009; Maisel et al. 2012).

Die AAA+-Domäne nimmt nahezu die gesamte CoxD-Sequenz ein. Zudem zeigt sich in der Sekundärstruktur eine für AAA+-Domänen typische Gliederung (Hanson und Whiteheart 2005) in eine $\alpha\beta$ -Subdomäne (N-terminal) und eine α -helikale Domäne am C-Terminus (Maisel 2012). Erstere enthält den N-Linker (A¹⁷G) und die Motive Walker A (G⁴³EAGVGKT), den P-loop (C⁷⁰YEG), Walker B (V¹³⁰LLIDEVD), den Sensor 1 (N¹⁷⁷) und den Argininfinger (R¹⁸⁹) (Pelzmann et al. 2009; Maisel 2012). Der N-Linker ist Teil der „Tasche“, welche den Nukleotid-Ring koordiniert, und liegt in direkter Nachbarschaft zu diesem (Neuwald et al. 1999). Seine Sequenz ist konserviert und dient der Übertragung von Konformationsänderungen auf andere Bereiche des AAA+-Proteins (Smith et al. 2004). Die Motive Walker A, P-loop und Walker B bzw. dort enthaltene konservierte Aminosäure-Reste spielen eine entscheidende Rolle bei der Nukleotidbindung und bei der Koordination des Mg²⁺, welches für die ATP-Hydrolyse essentiell ist. Der P-loop tritt in CoxD in modifizierter Form auf. Anstelle der sonst üblichen Aminosäure-Abfolge (aromatisch-hydrophob-Glycin) findet sich auf CoxD SH-aromatisch-hydrophil-Glycin (C⁷⁰YEG). Insbesondere das Cystein⁷⁰ könnte dabei eine Funktion bei der Inkorporation des Schwefels in das aktive Zentrum von CO-Dehydrogenase haben (Pelzmann et al. 2009; Maisel 2012). Das Motiv Walker B spielt eine entscheidende Rolle für die ATPase-Aktivität und beim nukleophilen Angriff auf das γ -Phosphat des ATPs (Ogura und Wilkinson 2001; Leipe et al. 2003). Beim Sensor 1 handelt es

sich um einen konservierten, polaren Aminosäure-Rest. Dieser fungiert als Sensor für die Nukleotidbindung und -hydrolyse und interagiert (wie auch der Argininfinger) mit dem γ -Phosphat des ATP (Snider et al. 2008). Der Argininfinger hat darüber hinaus eine wichtige Funktion bei der Kommunikation der Untereinheiten (Johnson und O'Donnell 2003).

Die α -helikale Domäne am C-Terminus von CoxD enthält den Sensor 2, welcher ebenfalls mit dem γ -Phosphat des ATP interagiert. Ferner wird angenommen, dass dieser konservierte Aminosäure-Rest entscheidend ist für die Übertragung konformationeller Veränderungen von der N-terminalen auf die C-terminale Domäne von CoxD. Zusätzlich findet sich am C-terminalen Ende der CoxD-Sequenz das VWA-Bindemotiv R²⁵⁹AE, welches Interaktionen mit der VWA-Domäne auf CoxE ermöglichen würde (Pelzmann et al. 2009; Maisel et al. 2012).

Die bioinformatische Analyse weist CoxD als AAA+-Chaperon aus. Maisel et al. (2012) vermuteten, dass die Chaperon-Funktion die Konformation der CO-Dehydrogenase dahingehend ändern könnte, dass die Prozesse zur Reifung des aktiven Zentrums stattfinden können, da dieses 17 Å unterhalb der Oberfläche verborgen liegt und nur durch einen Substratkanal erreicht werden kann (Dobbek et al. 1999). Insbesondere wurde vermutet, dass CoxD an einer kurzen Peptid-Kette Cystein-Persulfide präsentiert und der cyanolysierbare Schwefel von dort in das aktive Zentrum der teilweise entfalteten CO-Dehydrogenase übertragen wird (Maisel et al. 2012). Die Tatsache, dass Verbindungen wie L-Cystein oder β -Mercaptoethanol das aktive Zentrum problemlos erreichen können und an das Mo in Cu-defizienten Spezies binden können (vgl. Kap. 3.21, Abb. 3-40 bis 3-42), spricht jedoch gegen diese Vermutungen, obgleich CoxD als Schwefeltransferase fungieren könnte. Eine weitere Funktion von CoxD könnte allerdings auch darin bestehen, die Translation von CoxE und CoxF zu initiieren. So zeigt CoxD Motive der Familie der DEAD-Box RNA-Helikasen (siehe hierzu Kap. 4.2). Diese Motive schließen einen Teil der diskutierten Sequenzen auf CoxD mit ein.

CoxE zeigt einen hohen Arginin-Gehalt (12,5 %, Gnida et al. 2003) und enthält eine von Willebrand Faktor A (VWA) - Domäne am C-Terminus. Von Willebrand-Proteine haben Funktionen bei der Bildung und Auflösung von Multiproteinkomplexen (Whittaker and Hynes 2002). In diesem Zusammenhang wäre eine Interaktion mit CoxD, CoxF oder auch der großen Untereinheit CoxL von CO-Dehydrogenase denkbar, da diese allesamt VWA-Bindemotive auf ihrer Sequenz zeigen. Innerhalb dieser Ligandenbindestelle von CoxE findet sich zudem ein MIDAS-Motiv (Staron 2008; Dr. A. Pelzmann, persönliche Mitteilung). Auch

auf CoxE finden sich Motive der DEAD-Box RNA-Helikasen (vgl. hierzu Kap. 4.2), was eine Funktion bei der Translation von CoxF suggeriert, da in Abwesenheit von CoxE auch kein CoxF-Polypeptid vorhanden ist (Kap. 3.7, Abb. 3-8, Tab. 3-5; Kap. 3.9, Abb. 3-16).

Die diskutierten Motive auf den Sequenzen von CoxD und CoxE sind übersichtsartig in Abb. 4-1 zusammengefasst.

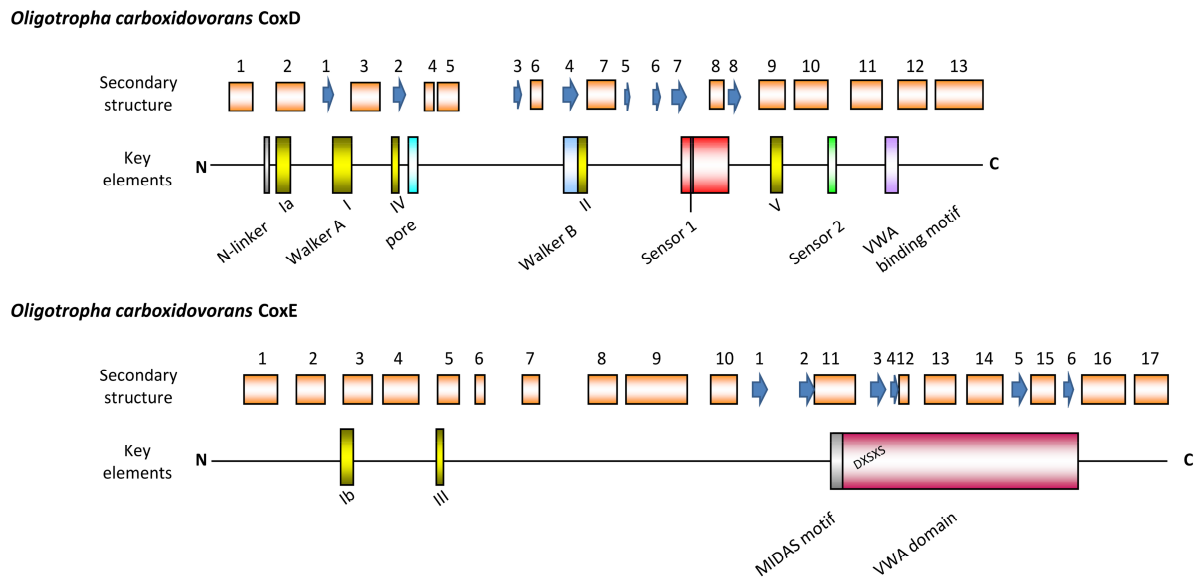


Abbildung 4-1: Vorhergesagte Sekundärstruktur-Elemente und Motive der Polypeptide CoxD und CoxE aus *O. carboxidovorans* OM5 (aus Pelzmann et al. 2014).

Die Vorhersage der Sekundärstrukturen erfolgte mit Hilfe des Servers SABLE (Kap. 2.35). α -Helices sind in orange dargestellt, β -Faltblätter in blau. Die weißen Bereiche dazwischen stellen ungeordnete Bereiche und *loop* dar. Die Sequenz wurde zusätzlich über verschiedene Protein-Datenbanken des ExpASY Bioinformatics Resource Portal Servers und Conserved Domain Database auf Schlüsselemente und Motive untersucht, welche übersichtsartig zusammengefasst sind. So finden sich auf CoxD die Motive N-Linker, Walker A, *pore loop*, Walker B, Sensor 1 und 2, welche allesamt Schlüsselemente einer AAA+-Domäne darstellen, sowie ein VWA-Bindemotiv am C-terminalen Ende. CoxE enthält eine VWA-Domäne am C-Terminus mit einem MIDAS-Motiv. Für CoxD und CoxE sind außerdem Motive der Familie der DEAD-Box RNA-Helikasen aufgeführt. Farbcode: α -Helices orange; β -Faltblätter blau; Motive der DEAD-Box Proteinfamilie gelb. Abkürzungen: MIDAS, metal ion adhesion site; VWA, von Willebrand Faktor A.

Die bioinformatische Betrachtung der Sequenz von CoxF zeigte eine Reihe von Motiven, welche in Zusammenhang mit der Reifung des bimetallischen Clusters von CO-Dehydrogenase gebracht werden können. So wird für das N-terminale Ende ein Motiv der

XdhC/CoxI-Familie verhergesagt, sowie eine XdhC Rossmann-Domäne für den C-Terminus. Die Reifung von Enzymen der Familie der Molybdän-Hydroxylasen erfordert in der Regel spezifische Proteine der XdhC-Familie (Neumann und Leimkühler 2011). XdhC aus *Rhodobacter capsulatus* ist selbst keine Untereinheit von Xanthin-Dehydrogenase, wird aber bei der Reifung dieses Enzyms benötigt. So wird in Abwesenheit von XdhC eine inaktive XDH synthetisiert. Es wird angenommen, dass XdhC eine Funktion bei der Sulfurierung des Mo-Ions hat, indem das Polypeptid mit der L-Cystein-Desulfurase NifS4 interagiert (Neumann et al. 2007a; Neumann und Leimkühler 2011). Ferner scheint XdhC die sulfurierte Form zu stabilisieren und den Schwefel vor oxidativen Prozessen zu schützen. Als weitere Funktion wird vermutet, dass XdhC den Molybdän-Kofaktor in apo-XDH inseriert und nach Inkorporation als Chaperon zur korrekten Faltung von XDH beiträgt (Neumann et al. 2006, 2007a; Neumann und Leimkühler 2011). In der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante konnten 1,85 mol Mo pro mol Enzym nachgewiesen werden (Kap. 3.13, Tab. 3-9), was eine Funktion von CoxF als Insertase für den Kofaktor ausschließt (vgl. hierzu Kap. 4.6), allerdings konnte ein hoher Anteil an [MoO₃]-Spezies im Präparat ausgemacht werden (Kap. 3.15, Abb. 3-25; Kap. 3.21, Abb. 3-42), was darauf hindeutet, dass der Sulfido-Ligand des Mo in Abwesenheit von CoxF nicht stabil ist und durch einen Oxo-Liganden ersetzt wird.

Dass CoxF zusätzlich eine Funktion bei der Insertion von Cu in das aktive Zentrum besitzt, zeigt sich einerseits an der Cu-Defizienz des F::km-Präparates und andererseits daran, dass ein Cu-Bindemotiv auf der Sequenz von CoxF gefunden werden kann (Kap. 3.1, Abb. 3-1). So findet sich auf CoxF die Sequenz M¹⁰⁷CPSHGTM, welche eine für blaue Kupferenzyme (Cu-Enzyme vom Typ 1) charakteristische Anordnung der Aminosäuren Cystein, Histidin und Methionin aufweist (Karlin et al. 1997).

Wie auch CoxD besitzt auch CoxF ein VWA-Bindemotiv (R¹⁹¹GD), welches Interaktionen mit der VWA-Domäne auf CoxE ermöglicht.

Am C-terminalen Ende von CoxF liegt ein für saure Histidin-Phytsen charakteristisches Motiv vor (Yao et al. 2012). Phytsen stellen eine Klasse von Phosphatasen dar, welche Phytat zu *myo*-Inositol-Derivaten und Phosphat hydrolysieren (Wyss et al. 1999). Abhängig davon, an welcher Position des *myo*-Inositol-Ringes die Dephosphorylierung beginnt, werden 3-, 5- und 6-Phytsen unterschieden. Auf Basis ihres pH-Optimums können Phytsen in zwei größere Klassen unterteilt werden, die sauren und alkalischen Phytsen. Zu ersteren werden purple acid phosphatases (PAPs), Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTP) - ähnliche Phytsen und saure Histidin-Phosphatasen (HAPs) gezählt. Den Mitgliedern der Klasse der HAPs ist das konservierte Heptapeptid-Motiv RHGXRXR gemeinsam (van Etten

et al. 1991), welches auch auf CoxF vorliegt (R²⁶⁵HGQRRQ), sowie ein katalytisch aktives Dipeptid HD, für welches auf CoxF die Entsprechungen H⁹⁰G, H¹¹¹G und D¹⁵⁸H zu finden sind. Die bisherige biochemische Charakterisierung bakterieller Phytasen hat gezeigt, dass diese ihr pH-Optimum im Bereich 4,5 bis 8,5 haben, mit spezifischen Aktivitäten von 16 bis 3960 U/mg (Yao et al. 2012). Es handelt sich zumeist um monomere Proteine, mit molekularen Massen von 37 bis 45 kDa (Vohra et al. 2003; Oh et al. 2004). Dennoch konnten Phytat-abbauende Enzyme identifiziert werden, welche multiple Untereinheitenstrukturen ausbilden. So liegt das Phytat-hydrolysierende Protein aus *Schwanniomyces castellii* als Heterotetramer vor, mit einer großen Untereinheit (125 kDa) und drei identischen kleinen Untereinheiten (70 kDa) (Segueilha et al. 1992). Als weiteres Beispiel kann eine Phytase aus *Aspergillus oryzae* genannt werden, von der vermutet wird, dass sie eine homohexamere Struktur ausbildet (Yamamoto et al. 1972).

Darüber hinaus lassen sich auf der Sequenz von CoxF (wie auch bei CoxD und CoxE) Motive der Familie der DEAD-Box RNA-Helikasen finden (vgl. hierzu Kap. 4.2).

4.2 Die Polypeptide CoxD, CoxE und CoxF zeigen Motive der Familie der DEAD-Box RNA-Helikasen

Die Entwindung und das Auftrennen doppelsträngiger Nukleinsäure-Strukturen werden durch RNA- und DNA-Helikasen katalysiert. Diese Enzyme binden und hydrolysieren Nukleotid-Triphosphate (z.B. ATP) und die dabei frei-werdende Energie wird schließlich zur Dissoziation der Einzelstränge bzw. zur Dissoziation gebundener Proteine genutzt (Cordin et al. 2006). Helikasen können in drei Superfamilien und zwei Familien eingeteilt werden, welche als SF1 - SF5 bezeichnet werden. Die Klassifizierung erfolgte aufgrund des Vorkommens und der Charakteristika konservierter Motive (Gorbalenya und Koonin 1993). Allen gemeinsam sind die konservierten Motive Walker A und B (Walker et al. 1982), welche häufig in der Sequenz von NTPasen gefunden werden können. Zudem werden in den Familien SF3, SF4 und SF5 hauptsächlich bakterielle Helikasen gefunden, die hexamere Strukturen ausbilden (Patel und Picha 2000). DEAD-Box RNA-Helikasen und die verwandten Familien DEAH, DEXH und DEXD (allgemein DEXD/H) zählen zur SF2-Superfamilie und besitzen mindestens 9 konservierte Motive (Tanner und Linder 2001). Untereinander lassen sich diese sehr eng verwandten Familien durch Variationen in ihren konservierten Motiven unterscheiden (Abb. 4-2).

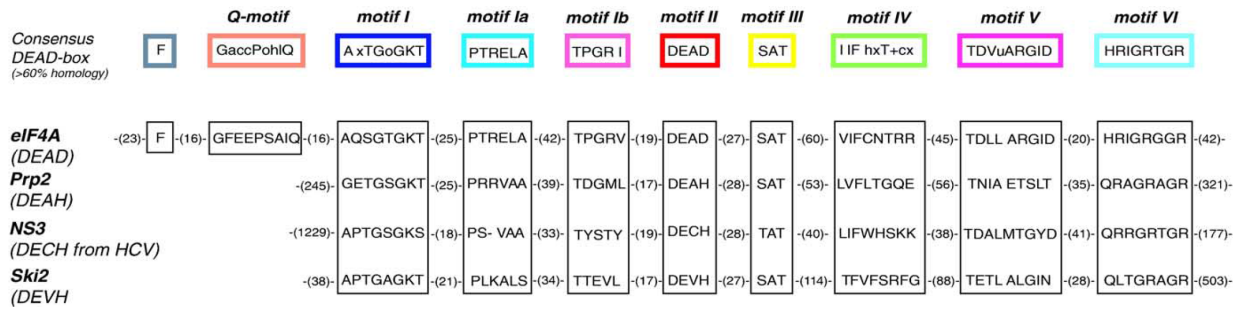


Abbildung 4-2: Konservierte Motive der DEAD-Box- und verwandten DEXD/H-Box-Familien von RNA-Helikasen (aus Cordin et al. 2006).

Die Sequenzen der konservierten Motive von *S. cerevisiae* eIF4A (DEAD-Box Protein), Prp2 (DEAH-Box Protein), NS3 (DECH-Helikase des Hepatitis C-Virus) und Ski2 (DEXH, Ski2-Familie) sind einander gegenüber gestellt. Erklärung verwendeter Symbole: o: S, T; l: I, L, V; x: beliebiger Rest; a: F, W, Y; c: D, E, H, K, R; h: A, F, G, I, L, M, P, V, W, Y; +: H, K; u: A, G.

Die DEAD-Box Helikasen bilden die größte Familie. Es konnte gezeigt werden, dass Mitglieder dieser Familie ATPase- und Helikase-Aktivitäten aufweisen sowie teilweise in der Lage sind, an RNA-Strukturen zu binden (Tanner et al. 2003) und bei der Initiation der Translation mitzuwirken (Rocak und Linder 2004). Die Bezeichnung „DEAD-Box“ geht auf die konservierte Aminosäure-Sequenz Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD) des Walker B - Motivs zurück.

Translationsanalysen zeigten, dass die Proteine CoxE und CoxF in Abwesenheit von CoxD nicht translatiert werden, obwohl die entsprechenden mRNAs nachgewiesen werden konnten und damit kein polarer Effekt vorliegen kann (Pelzmann et al. 2009). Des Weiteren erfordert die Translation von CoxE die Anwesenheit von CoxF und umgekehrt (Kap. 3.7, Abb. 3-8, Tab. 3-5; Kap. 3.9, Abb. 3-16). Diese Befunde deuten auf einen Regulationsmechanismus auf Translationsebene hin. So ergab die Sequenzanalyse der Proteine CoxD, CoxE und CoxF, dass CoxD fünf homologe Sequenzen zu den konservierten DEAD-Box-Motiven aufweist (Abb. 4-1): Ia, P²¹DRDLA²⁶; I, G⁴³EAGVGKT⁵⁰; IV, L⁶⁴IR⁶⁶; II, D¹³⁴EVD¹³⁷; V, A²⁰⁴RIIT²⁰⁸. Zwei weitere Motive befinden sich auf CoxE (Abb. 4-1): Ib, T⁵⁴PSR⁵⁷; III, S⁹¹AT⁹³, sowie auch auf CoxF: III, S³¹LT³³ and S¹⁷⁸GT¹⁸⁰; IV, L²²⁴TV²²⁶ (Abb. 3-1 und 4-3). Aufgrund des Vorkommens dieser Sequenzen ist vorstellbar, dass CoxD RNA-Helikase-Funktionen besitzt, welche für die spezifische Initiation der Translation von CoxE und CoxF von Bedeutung sind: Motiv I (Walker A) kommt eine entscheidende Rolle bei der Bindung und Hydrolyse von

Nukleotid-Triphosphaten zu (Walker et al. 1982). Letztere geschieht in Kombination mit Motiv II (Walker B), welches ebenfalls für die ATPase-Aktivität notwendig ist. Maisel et al. (2012) konnten eine derartige Funktion, die Hydrolyse von MgATP, bereits nachweisen. Die Motive Ia, IV und V scheinen für die RNA-Bindung notwendig zu sein (Rogers et al. 2002), für Motiv V kann auch eine Beteiligung an der ATPase- und Helikase-Aktivität nicht ausgeschlossen werden (Caruthers et al. 2000).

Im Gegensatz zu CoxD weisen CoxE und CoxF nur jeweils zwei unterschiedliche DEAD-Box-Motive auf. Die Motive Ib und III auf CoxE und das Motiv III auf CoxF sind allerdings nicht auf CoxD vorhanden. Wie das auf CoxD-befindliche Motiv Ia, so ist auch Ib notwendig für die RNA-Bindung, während das Motiv III die ATPase- und Helikase-Aktivität verbindet. So wirkten sich Mutationen in Motiv III von eIF4A im Verlust der Helikase-Aktivität aus (Pause und Sonenberg 1992; Rocak et al. 2005). Die Befunde insgesamt deuten auf eine Kooperation zwischen CoxD, CoxE und CoxF in ihrer Translation hin, welche durch spezifische RNA-Helikase-Aktivität erklärt werden kann.

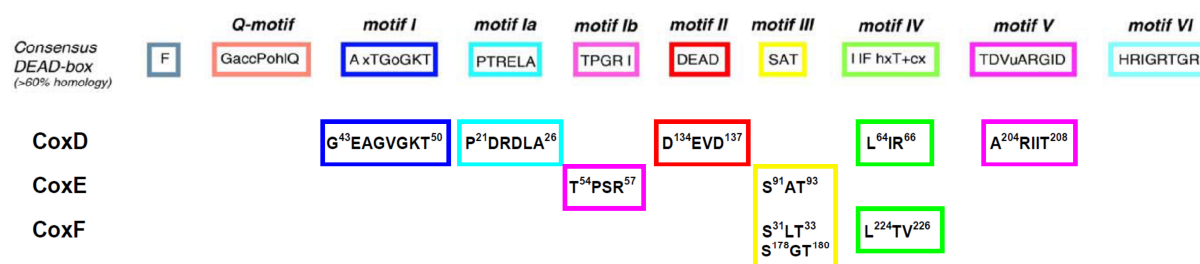


Abbildung 4-3: Konservierte Motive der Familie der DEAD-Box RNA-Helikasen und entsprechende homologe Motive auf den Polypeptiden CoxD, CoxE und CoxF.

Die Konsensus-Sequenzen der Motive der DEAD-Box RNA-Helikasen (erste Zeile, aus Cordin et al. 2006) sind den entsprechenden Sequenzen der Proteine CoxD, CoxE und CoxF zugeordnet. Abgesehen vom Q-Motiv und dem Motiv VI lassen sich für sämtliche anderen Motive homologe Sequenzen auf den Proteinen CoxD, CoxE und CoxF finden.

4.3 Die Funktionen von *CoxF* und *CoxG* für das CO-chemolithoautotrophe Wachstum von *O. carboxidovorans* OM5

Die Oxidation von CO zu CO₂ wird in *O. carboxidovorans* OM5 durch das Enzym CO-Dehydrogenase katalysiert (Meyer et al. 1993a). Die Elektronen, die frei werden bei dieser Reaktion, werden vom aktiven Zentrum des Enzyms über die beiden Fe-S-Zentren zum FAD-Kofaktor und von dort in die CO-insensitive Atmungskette eingespeist (Cypionka und Meyer 1983). Das entstandene CO₂ wird über den CBB-Zyklus assimiliert und dient dem Aufbau von Zellmasse (Meyer et al. 1993a). Für die Nutzung von CO kodiert der *cox*-Gencluster auf dem Megaplasmid pHCG3, welcher nur in Gegenwart von CO transkribiert wird. Stromabwärts der Strukturgene für die Untereinheiten von CO-Dehydrogenase liegt der Subcluster *coxDEFG*, welcher für Funktionen der postrationalen Reifung des aktiven Zentrums von CO-Dehydrogenase kodiert (Santiago et al. 1999; Fuhrmann et al. 2003).

Durch Insertion einer Kanamycin-Resistenzkassette wurde das *coxF*-Gen inaktiviert (Kap. 2.4). Der resultierende Mutantenstamm *O. carboxidovorans* OM5 F::km war nicht mehr in der Lage, mit CO als alleiniger Energie- und Kohlenstoffquelle zu wachsen. (Kap. 3.10; Abb. 3-17, B). Das Wachstum mit H₂ als Energiequelle (kodiert über den *hox*-Gencluster) und CO₂ als Kohlenstoffquelle war nicht beeinträchtigt. Hier zeigte der Mutantenstamm F::km das gleiche Verhalten wie ein unter identischen Bedingungen angezüchteter Wildtyp (Kap. 3.10; Abb. 3-17, A). Somit zeigt sich, dass *CoxF* eine essentielle Funktion im CO-chemolithoautotrophen Stoffwechsel besitzen muss.

Für das CO-chemolithoautotrophe Wachstum sind damit die Genfunktionen von *coxD*, *coxE* und *coxF* essentiell. Analog zu *coxF* wurden auch Insertionsmutanten von *coxD* und *coxE* erzeugt. Pelzmann et al. (2009) konnten zeigen, dass die Mutante D::km ebenso die Fähigkeit verloren hat, mit CO als alleiniger Energie- und Kohlenstoffquelle zu wachsen, wobei das Wachstum mit H₂ und CO₂ nicht beeinträchtigt war und auch mit dem des Wildtyps verglichen werden konnte. Die Charakterisierung der *coxE*-Mutante lieferte ein ähnliches Ergebnis: Auch dieser Mutantenstamm konnte nur in Gegenwart von H₂ und CO₂ angezüchtet werden, nicht aber CO-chemolithoautotroph (Staron 2008; Dr. A. Pelzmann, persönliche Mitteilung).

Die Notwendigkeit der *coxF*-Genfunktion wird darüber hinaus bei Betrachtung der *coxG*-Insertionsmutante deutlich. Auch hier erfolgte die Inaktivierung durch Insertion einer Kanamycin-Resistenzkassette (Kap. 2.5). Der entsprechende Mutantenstamm G::km war allerdings in der Lage CO-chemolithoautotroph zu wachsen, obgleich sich die Generationszeit

von 18 h (Wildtyp) auf 149 h erhöhte. Die Nutzung von H₂ und CO₂ war nicht beeinträchtigt (Kap. 3.10; Abb. 3-17, C). Dies zeigt, dass im Gegensatz zu *coxF* die *coxG*-Funktion nicht mehr zwangsläufig für die Nutzung von CO benötigt wird. So besaß das aufgereinigte CO-Dehydrogenase-Präparat der *coxG*-Mutante CO-oxidierende Aktivität (Hager 2011) und einen nahezu vollständigen Gehalt an cyanolysierbarem Schwefel und Cu(I) (2,05 bzw. 1,77 mol pro mol Protein, Kap. 3.13). Die enorm verringerte Teilungsrate im CO-chemolithoautotrophen Wachstum der *coxG*-Mutante ist damit nicht auf eine unvollständig assemblierte CO-Dehydrogenase zurückzuführen. Vielmehr scheint das Enzym nicht mehr in der Lage zu sein, mit der Cytoplasma-Membran zu interagieren (Behrends 2000), was Rückschlüsse auf die Funktion von CoxG als Membrananker zulässt.

4.4 In der *coxF*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 wird eine inaktive CO-Dehydrogenase gebildet, die komplett in ihrer Untereinheitenstruktur und Kofaktor-Assemblierung ist

Wie auch die Strukturgene *coxMSL*, so wird auch der Subcluster *coxDEFG* CO-spezifisch transkribiert (Santiago et al. 1999; Fuhrmann et al. 2009). Da der Mutantenstamm F::km nicht mehr in der Lage war, mit CO als alleiniger Energie- und Kohlenstoffquelle zu wachsen, erfolgte die Anzucht chemolithoautotroph mit H₂ und CO₂ in Gegenwart von CO als Induktor für die Biosynthese von CO-Dehydrogenase (Kap. 3.10; Abb. 3-17, B) (Behrends 2000; Staron 2008; Pelzmann et al. 2009). Die unter diesen Bedingungen synthetisierte CO-Dehydrogenase war vollständig in ihrer (LMS)₂-Untereinheitenstruktur, was anhand von denaturierenden Polyacrylamid-Gelen gezeigt werden konnte (Kap. 3.11; Abb. 3-20, B; Kap. 3.12). Das Untereinheiten-Verhältnis L:M:S konnte videodensitometrisch zu 1:1:1 bestimmt werden. In nativen Gelen besaß das Mutanten-Enzym das gleiche Wanderungsverhalten wie das Wildtyp-Präparat (Kap. 3.11; Abb. 3-20, A; Kap. 3.12). Daraus kann gefolgert werden, dass CoxF wie auch CoxE (Dr. A. Pelzmann, persönliche Mitteilung) und CoxD (Pelzmann et al. 2009) keine Funktion bei der Assemblierung der Untereinheiten besitzen.

Im Vergleich zum aufgereinigten Wildtyp-Präparat (23 U/mg, Meyer et al. 2000) besaß die CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante eine äußerst niedrige CO-oxidierende Aktivität (0,136 U/mg) (Kap. 3.13, Abb. 3-21). Diese Restaktivität (0,6 %) lässt auf einen minimalen Anteil intakter CO-Dehydrogenase schließen, wobei nicht ausgeschlossen werden

kann, dass es in geringem Umfang zu Rückmutationen kam oder Wildtyp-Zellen eingeschleppt wurden. Das Wachstum letzterer während des Fermentationsprozesses wäre in diesem Fall durch das zugegebene Kanamycin (vgl. Kap. 2.7.1) inhibiert worden, weswegen der Wildtyp-Anteil stets gering geblieben wäre, da nur die Mutante die Kanamycin-Resistenzkassette besitzt.

Auch das Präparat der *coxG*-Mutante war in Bezug auf Untereinheitenstruktur und Mobilität in nativen Gelen vom Wildtyp ununterscheidbar (Hager 2011; Dr. A. Pelzmann, persönliche Mitteilung). Die aufgereinigte CO-Dehydrogenase besaß eine Aktivität von 4,36 U/mg. Diese CO-oxidierende Aktivität macht damit zwar nur 19 % derjenigen des Wildtyp-Präparates mit 23 U/mg aus, jedoch muss berücksichtigt werden, dass unterschiedliche Wildtyp-Präparate durchaus verschiedene CO-oxidierende Aktivitäten besitzen können. So konnten CO-Dehydrogenasen aufgereinigt werden, die trotz eines nahezu vollständig assemblierten Metall-Clusters nur Aktivitäten von z.B. 1,6 oder 4,2 U/mg zeigten (Dr. O. Kreß, persönliche Mitteilung).

Während der Oxidation von CO zu CO₂ werden Elektronen frei, welche vom aktiven Zentrum in der CoxL-Untereinheit über die beiden Fe-S-Zentren in CoxS zum FAD-Kofaktor im Flavoprotein CoxM fließen (Gremer et al. 2000; Dobbek et al. 2002), ehe sie auf die CO-insensitive Atmungskette übertragen werden (Meyer et al. 1993a). Dies verdeutlicht, dass eine Reihe von Kofaktoren als auch prosthetischer Gruppen für ein katalytisch aktives Enzym notwendig ist. Die Charakterisierung der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante sollte dementsprechend auch der Frage nachgehen, ob die Mutation Auswirkungen auf die Elektronentransportkette hat.

Zunächst wurde dabei der Mo-MCD-Kofaktor betrachtet. Die Aufnahme von Molybdän in Zellen verschiedenster Organismen erfolgt in Form des Molybdat-Anions. In Bakterien übernehmen spezifische Molybdat-Bindeproteine (mit einer Kapazität von bis zu 8 Anionen) diese Aufgabe, oder hoch-affine Transporter des ABC-Typs. Diese bestehen aus drei Proteinkomponenten (ModABC) und benötigen für den Transport die Hydrolyse von ATP (Pau et al. 1997; Pau und Lawson 2002). Mit Ausnahme der bakteriellen Nitrogenase wird das Mo an eine einzigartige trizyklische Pterin-Komponente, den Molybdän-Kofaktor, gebunden, welcher wiederum in verschiedene Apo-Enzyme inkorporiert wird (Johnson et al. 1980; Hille 2005; Mendel und Bittner 2006). Die Biosynthese dieses Kofaktors erfolgt in Bakterien in vier Schritten (Webb et al. 2007) und erfordert die Genfunktionen *moeA*, *moaA*, *moaC* und *moaD*, welche wie die Gene des Molybdat-Transportsystems auf dem *mol*-Gencluster lokalisiert sind (Rajagopalan 1996, 1997).

Die Sequenzanalyse von CoxF ergab, dass das Polypeptid Homologien zu XdhC aus *R. capsulatus* aufweist. So besitzt CoxF am N-Terminus eine XdhC-Domäne mit 39,6 % Identität sowie C-terminal eine XdhC Rossmann - Domäne mit 20,7 % Identität (Kap. 3.1, Abb. 3-1). Das Genprodukt von *xdhC* in *R. capsulatus* spielt eine entscheidende Rolle bei der Insertion des Molybdän-Kofaktors in Xanthin-Dehydrogenase und wird mit den Strukturgenen *xdhA* und *XdhB* kotranskribiert (Leimkühler und Klipp 1999). Die Funktionen von XdhC reichen von der Interaktion mit der L-Cystein-Desulfurase NifS4 (welche das Mo sulfuriert) über den Schutz des Sulfido-Liganden bis hin zur Insertion des Kofaktors (Neumann et al. 2007a; Neumann und Leimkühler 2010). Unter diesem Gesichtspunkt war ein Einfluss der Mutation im *coxF*-Gen auf die Kofaktor-Biosynthese oder -Insertion nicht auszuschließen. Auf das Vorhandensein des Mo-MCD-Kofaktors in der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante deutete zunächst der gemessene Mo-Gehalt von 1,85 mol pro mol Enzym hin (Kap. 3.13, Tab. 3-9). Zudem zeigten ESR-Messungen bei 120 K ein redoxaktives Mo-Ion, welches in oxidiertem Zustand zu 82 - 86 % als Mo(VI) und zu 16 - 18 % als Mo(V) vorlag und durch Na-Dithionit reduziert werden konnte (Kap. 3.18, Abb. 3-30, A und Kap. 3.21, Abb. 3-42, A, Spur „ohne R-SH“).

Die CoxS-Untereinheit von CO-Dehydrogenase (lokalisiert zwischen der CoxL- und CoxM-Untereinheit) kann in zwei Domänen unterteilt werden, wobei jede einen Typ von [2Fe-2S]-Clustern trägt. Die N-terminale Domäne zeigt eine Faltung, welche der des pflanzlichen [2Fe-2S]-Ferredoxins ähnelt, und enthält den distalen Fe-S-Cluster, welcher das charakteristische Typ II - ESR-Signal hervorruft. Der Cluster liegt in direkter Nähe zum Isoalloxazin-Ring des FAD und ist am Interface der CoxM- und CoxL-Untereinheit lokalisiert. Er ermöglicht den Elektronentransfer vom Typ I [2Fe-2S]-Cluster zum FAD. Der Typ I - Cluster in der C-terminalen Domäne der CoxS-Untereinheit scheint in Bezug auf Bindemotiv und Faltung charakteristisch für Molybdän-Hydroxylasen zu sein (Dobbek et al. 1999, 2001). Die Biosynthese derartiger Fe-S-Zentren wurde beispielsweise am Enzym Nitrogenase aus *Azotobacter vinelandii* untersucht. Nitrogenase katalysiert die Reduktion von N₂ (Burgess und Lowe 1996) und besteht aus der Dinitrogenase, einem $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramer, sowie der Dinitrogenase-Reduktase, einem Homodimer. Letztere überträgt Elektronen von Ferredoxin mittels eines [4Fe-4S]-Clusters auf den P-Cluster von Dinitrogenase, dem Mo-Fe-Protein. Bei diesem P-Cluster handelt es sich um einen [8Fe-7S]-Cluster, welcher anschließend die Elektronen auf den Fe-Mo-Kofaktor (FeMoCo) überträgt. Dieser reduziert schließlich N₂ zu NH₃ (Dos Santos et al. 2004). Die Biosynthese der Fe-S-Zentren erfolgt über die Proteine NifS und NifU (vgl. auch Kap. 4.6, Abb. 4-5), welche Eisen und Schwefel

für die Cluster-Bildung mobilisieren. Es wird davon ausgegangen, dass NifS, eine Pyridoxalphosphat-abhängige Cystein-Desulfurase, ein Protein-gebundenes Cystein-Persulfid erzeugt, welches auf NifU zur Erzeugung von [2Fe-2S]- und [4Fe-4S]-Einheiten übertragen wird (Smith et al. 2005; Hu und Ribbe 2013).

Die Analyse des säurelabilen Schwefels (Kap. 3.13, Tab. 3-9) ergab für die CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante einen Gehalt von 7,73 mol pro mol Enzym, was annähernd dem theoretischen Wert von 8,0 mol für die insgesamt vier [2Fe-2S]-Zentren entspricht. Zudem konnte mittels UV/VIS-Spektroskopie gezeigt werden, dass die Zentren redoxaktiv sind (Kap. 3.14, Abb. 3-24). Durch die Zugabe von Na-Dithionit war eine Reduktion möglich, was ESR-spektroskopisch nachgewiesen wurde (Kap. 3.17, Abb. 3-29). Die hier erhaltenen Spektren waren von denen eines Wildtyp-Präparates ununterscheidbar und entsprachen zudem denen der CO-Dehydrogenase aus der *coxD*-Mutante (Pelzmann et al. 2009). Wie CoxD hat somit auch CoxF keine Funktion bei der Synthese der [2Fe-2S]-Zentren.

Das Vorliegen des FAD-Kofaktors in der CO-Dehydrogenase der *coxF*-Mutante konnte zunächst mittels UV/VIS-Spektroskopie nachgewiesen werden (Kap. 3.14, Abb. 3-24). So konnte bei 450 nm ein für Molybdän-Hydroxylasen charakteristischer Peak ausgemacht werden (Meyer und Rajagopalan 1984), welcher durch Zugabe von Na-Dithionit ausgebleicht werden konnte. Zudem wurde der Gehalt an FAD chemisch bestimmt und lieferte einen Gehalt von 1,92 mol pro mol Enzym (Kap. 3.14, Tab. 3-11), was nahezu dem theoretischen Wert von 2,0 mol entspricht und mit dem Gehalt in einem Wildtyp-Präparat zu vergleichen ist (1,93 mol pro mol Protein). Der FAD-Kofaktor ist in der CoxM-Untereinheit von CO-Dehydrogenase lokalisiert und überträgt die Elektronen der CO-Oxidation auf den Chinonpool der Elektronentransportkette (Wilcoxon et al. 2011b). Gremer et al. (2000) waren in der Lage, M(LS)₂- und (LS)₂-Strukturen von wildtypischer CO-Dehydrogenase zu erzeugen. Die Dissoziation einer oder beider CoxM-Untereinheiten erfolgte durch Zugabe von Natrium-Dodecylsulfat. Im Anschluss konnte die CO-Dehydrogenase zum vollständigen (LMS)₂-Enzym rekonstituiert werden. Hierzu wurde die CoxM-Untereinheit rekombinant in *E. coli* überexprimiert. Das resultierende Polypeptid, welches sich als äußerst instabil erwies, zeigte eine monomere Untereinheitenstruktur und war nicht in der Lage, FAD zu binden. Die Rekonstitution der M(LS)₂- und (LS)₂-Spezies von CO-Dehydrogenase mit der rekombinanten CoxM-Untereinheit führte zur spontanen Ausbildung der (LMS)₂-Struktur, welche allerdings kein FAD enthielt. Durch Inkubation der Deflavo-(LMS)₂-Spezies mit FAD kam es zur Integration von 2 mol FAD pro mol Protein. Dies verdeutlicht, dass die FAD-Bindestelle in

CoxM nur in der vollständig assemblierten CO-Dehydrogenase funktionell ist. So führte die Rekonstitution der $(\text{LS})_2$ -Spezies mit rekombinantem CoxM zu konformationellen Veränderungen, welche zur Ausbildung einer FAD-Bindestelle führten (Gremer et al. 2000).

Anhand von UV/VIS-Spektroskopie und der chemischen Bestimmung konnte gezeigt werden, dass sich die Mutation im *coxF*-Gen nicht auf den Gehalt von FAD auswirkt und dieses auch redoxaktiv ist.

Somit liegt in der CO-Dehydrogenase der *coxF*-Mutante eine intakte Elektronentransportkette vor, welche alle erforderlichen Kofaktoren enthält. Diese liegen darüber hinaus in einem redoxaktiven Zustand vor.

4.5 Chemische Rekonstitution des aktiven Zentrums von CO-Dehydrogenase und ESR als Reporter für paramagnetische Mo-Zentren

Der von Resch et al. (2005) formulierte Mechanismus der chemischen Rekonstitution von CO-Dehydrogenase (Kap. 1.7, Abb. 1-18) geht von einem vollständig assemblierten $[\text{Mo}^{\text{VI}}(=\text{O})_2\text{-S-Cu-S-Cys}]$ -Cluster aus. Ein solches Präparat zeigt im Mo-ESR bei 120 K kein Signal, das ESR ist *silent*, da es sich um eine diamagnetische Spezies handelt (Kap. 3.21; Abb. 3-39, A, Spur „as isolated“). Unter anaeroben (aber nicht reduzierenden) Bedingungen können durch Cyanolyse Cu und S in Form von CuCN bzw. SCN^- freigesetzt werden, was in der Bildung eines $[\text{Mo}^{\text{VI}}(=\text{O})(\text{O}(\text{H}))_2]$ -Ions resultiert. Diese Spezies ist ebenfalls diamagnetisch und im ESR *silent* (Kap. 3.21; Abb. 3-40, A). Die Zugabe von Schwefelverbindungen wie Sulfid, L-Cystein oder β -Mercaptoethanol führt zu keiner Änderung im ESR-Spektrum – der Oxidationszustand des Mo ändert sich nicht, es kommt zu keinem Ligandenaustausch am Mo. Unter Dithionit-reduzierenden Bedingungen kann dagegen der äquatoriale Oxo-Ligand am Mo durch die entsprechende Schwefelverbindung ersetzt werden (Kap. 3.21; Abb. 3-40, B). Dies führt im Falle von Sulfid zur Sulfurierung des Mo. Im dabei herrschenden reduzierenden Milieu nimmt das Mo den Oxidationszustand +V an. Kay and Mitchell (1968) konnten anhand von Molybdän-Cystein-Komplexen zeigen, dass Mo in der Regel auch nicht weiter reduziert werden kann. Wird Dithionit aus dem Reaktionsansatz wieder entfernt (z.B. durch Gelfiltration), so kommt es weitestgehend zur Reoxidation des Mo zur Oxidationsstufe +VI. Dementsprechend ist ein Cyanid-inaktiviertes und resulfuriertes Präparat von CO-Dehydrogenase nahezu ESR-*silent* (Kap. 3.21; Abb. 3-41,

A, Spur „ohne R-SH“). Verbleibt Dithionit im Ansatz, so kann für das $[\text{Mo}(=\text{O})\text{OH}_{(2)}\text{-SH}]$ ein rhombisches Mo(V)-*slow*-Signal erhalten werden, welches charakteristisch für Cyanid-inaktivierte als auch resulfurierte Formen ist (Meyer et al. 2000; Resch et al. 2005).

Dass neben Sulfid auch R-SH-Komponenten wie β -Mercaptoethanol an das $[\text{MoO}_3]$ gebunden werden können, zeigt sich anhand von entsprechenden ESR-Spektren (Kap. 3.21, Abb. 3-40). Diese wurden zwar unter Dithionit-reduzierenden Bedingungen aufgenommen, zeigen jedoch ein paramagnetisches Mo(V)-Spektrum, welches sich deutlich vom rhombischen Mo(V)-*slow*-Signal unterscheidet. Nach Entfernen überschüssiger Schwefelkomponenten und Dithionit lässt sich ein solcher Ansatz darüber hinaus nicht mehr mit Cu(I) rekonstituieren.

Nach Sulfurierung mit Sulfid/Dithionit und Entfernung des reduzierenden Milieus zeigt ein entsprechendes Präparat nahezu kein ESR-Spektrum. Es kann daher von einem $[\text{Mo}^{\text{VI}}(=\text{O})\text{OH}_{(2)}\text{SH}]$ ausgegangen werden. Wird dieses mit Schwefelverbindungen wie Sulfid, L-Cystein und β -Mercaptoethanol inkubiert, so wird ein deutliches, paramagnetisches ESR-Signal bei 120 K erhalten. Dieses kann durch die Bindung der R-SH-Komponente an den Sulfido-Liganden des Mo erklärt werden. Im Zuge dessen wird ein Elektron auf das Mo(VI) übertragen und zu Mo(V) reduziert. Dieses Signal bleibt auch nach Entfernen des R-SH-Überschusses erhalten, weshalb von einer irreversiblen Bindung ausgegangen werden kann. Damit unterscheidet sich die Bindung an den Sulfido-Liganden des Mo maßgeblich von der Bindung eines Thiols an das Cu(I)-Ion in vollständig assemblierten Zentren. Kreß et al. (2014) konnten zeigen, dass die Bindung am Cu(I) zu keiner Veränderung des Oxidationszustandes des Cu oder Mo führt und reversibel ist.

Nach Sulfurierung der $[\text{Mo}^{\text{V}}(=\text{O})(\text{O}(\text{H}))_2]$ -Spezies (in Gegenwart von Dithionit) und Entfernung der Schwefelkomponenten liegt das Mo entgegen dem von Resch et al. (2005) postulierten Rekonstitutionsmechanismus wieder in der Oxidationsstufe +VI vor, was auf eine Reoxidation an der Luft hindeutet. Wird dieses Präparat schließlich (unter erneut anoxischen Bedingungen) mit $\text{Cu}[\text{SC}(\text{NH}_2)_2]_3\text{Cl}$ inkubiert, so kommt es zur Inkorporation des Cu(I) und zur Vervollständigung des Clusters. Der Oxidationszustand des Mo verbleibt dabei in Stufe +VI. Dies bestätigen auch ESR-Spektren rekonstituierter Enzym-Spezies bei 120 K (Resch et al. 2005).

4.6 Die Assemblierung des aktiven Zentrums von CO-Dehydrogenase *in vivo* erfolgt über verschiedene Typen von Mo-Zentren

Die Genprodukte des Subclusters *coxDEFG* erfüllen abgesehen von CoxG spezifische Funktionen bei der posttranslationalen Reifung des [CuSMoO₂]-Clusters. Der Prozess vollzieht sich am Molybdän-Kofaktor (Moco), welcher zunächst ein [Mo^{VI}O₃]-Ion aufweist, das durch das Endithiolat des Molybdopterin-Cytosin-Dinukleotids (MCD) koordiniert wird. Der Kofaktor liegt 17 Å unterhalb der Oberfläche der vollständig gefalteten Apo-CO-Dehydrogenase (Dobbek et al. 1999), welche bereits die Eisen-Schwefel-Zentren und den FAD-Kofaktor enthält. Hierbei unterscheidet sich die Reifung von CO-Dehydrogenase maßgeblich von derjenigen anderer Molybdo-Enzyme. So vollzieht sich beispielsweise die Reifung des Molybdän-Kofaktors von Xanthin-Dehydrogenase (XDH) in *R. capsulatus* außerhalb des Apo-Enzyms (Abb. 4-4) (Leimkühler und Klipp 1999; Neumann et al. 2006, 2007a). Neben den Strukturgenen *xdhA* und *xdhB*, welche für die Untereinheiten von Xanthin-Dehydrogenase kodieren, konnte mit *xdhC* ein weiteres Gen identifiziert werden, welches für die Aktivität des Enzyms essentiell ist, obgleich es sich bei dem entsprechenden Genprodukt um keine Untereinheit handelt. XDH wird als ($\alpha\beta$)₂ - Heterodimer synthetisiert, welches wie CO-Dehydrogenase vollständig im Gehalt an FAD und den Eisen-Schwefel-Clustern ist, jedoch keinen Moco enthält. Moco wird durch Insertion von Molybdän in MPT gebildet und (außerhalb des XDH-Apo-Enzyms) schließlich von XdhC gebunden. Die Sulfurierung erfolgt durch spezifische L-Cystein-Desulfurasen (NifS), welche mit XdhC interagieren und den Schwefel auf das Molybdän übertragen. XdhC bindet schließlich an die XdhB-Untereinheit, in welche dann der Kofaktor inseriert wird (vgl. Abb. 4-4) (Neumann et al. 2007a, 2007b; Neumann und Leimkühler 2011).

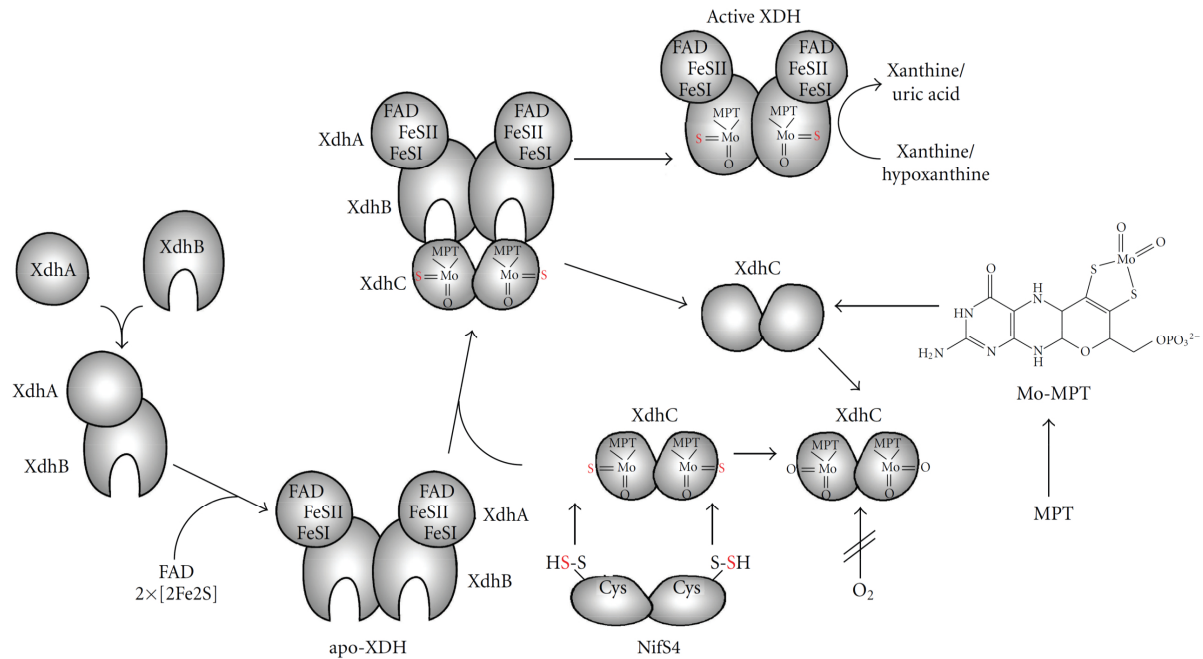


Abbildung 4-4: Assemblierung von Xanthin-Dehydrogenase (XDH) in *R. capsulatus* und die Rolle von XdhC bei der Reifung des Molybdän-Kofaktors (verändert aus Neumann und Leimkühler 2011).

Die Assemblierung von XDH in *R. capsulatus* geht von der Synthese und Dimerisierung der Untereinheiten XdhA und XdhB aus. Nach Insertion der FeS-Cluster I und II sowie des FAD-Kofaktors in die XdhA-Untereinheit kommt es abermals zur Dimerisierung zweier ($\alpha\beta$)-Dimere, wodurch eine Moco-freie Apo-XDH entsteht. Schließlich wird der sulfurierte MoCo durch XdhC inseriert, welches selbst keine Untereinheit von XDH darstellt. Moco (Mo-MPT) wird außerhalb von XDH durch die Insertion von Molybdän in MPT erzeugt und von XdhC gebunden. Durch Interaktion von XdhC mit spezifischen L-Cystein-Desulfurasen (NifS) und durch deren Schwefeltransferase-Funktion wird der äquatoriale Mo=S in Moco inseriert. Schließlich bindet XdhC an die XdhB-Untereinheit, in welche der Kofaktor inkorporiert wird (Leimkühler und Klipp 1999; Neumann et al. 2007a, 2007b; Neumann und Leimkühler 2011).

Auch die Biosynthese des Eisen-Molybdän-Kofaktors (FeMoCo) von Nitrogenase vollzieht sich außerhalb des Mo-Fe-Proteins NifDK (Abb. 4-5). Über eine Reihe von Proteinkomponenten, welche als Plattform fungieren, wird der Kofaktor zunächst schrittweise synthetisiert. Hierbei sind die Genprodukte von *nifS*, *nifU*, *nifB*, *nifE*, *nifN* und *nifH* maßgeblich beteiligt (Hu und Ribbe 2013). NifS und NifU mobilisieren Eisen und Schwefel zur Erzeugung von [2Fe-2S]- und [4Fe-4S]-Clustern (Smith et al. 2005). Letztere werden auf NifB übertragen, wo es zur Bildung des sog. K-Clusters aus zwei [4Fe-4S]-Einheiten kommt (Schwarz et al. 2009). Dieser Cluster wird in Gegenwart von S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) zu einem 8 Fe-Kern, dem L-Cluster, umgewandelt und auf NifEN übertragen (Wiig et al.

2011, 2012). Durch die NifH-vermittelte Insertion von Molybdän und Homocitrat entsteht schließlich der M-Cluster (FeMoCo) (Abb. 4-5). Der Austausch von Fe gegen Mo und Homocitrat ist dabei ein ATP-abhängiger Prozess. Während der Bildung des M-Clusters kommt es innerhalb von NifEN zu konformationellen Veränderungen, so dass sichergestellt wird, dass nur der [NifEN-M-Cluster]-Komplex mit NifDK interagieren kann (Hu et al. 2006a, 2006b, 2006c; Yoshizawa et al. 2009; Fay et al. 2010). Es kommt zur Komplexbildung zwischen NifEN (mit gebundenem M-Cluster) und NifDK. NifEN und NifDK zeigen dabei homologe Bindestellen für den M-Cluster. Allerdings lassen sich auf NifDK Aminosäure-Reste finden, welche als kovalente Liganden für den M-Cluster dienen oder den Cluster innerhalb der Polypeptid-Matrix halten könnten. Diese Elemente scheinen auf NifEN nicht vorhanden zu sein, so dass sich die Übertragung des M-Clusters über Diffusion von einer transienten Bindung an NifEN auf eine hoch-affine an NifDK vollziehen könnte (Hu et al. 2006a; Schwarz et al. 2009; Fay et al. 2010).

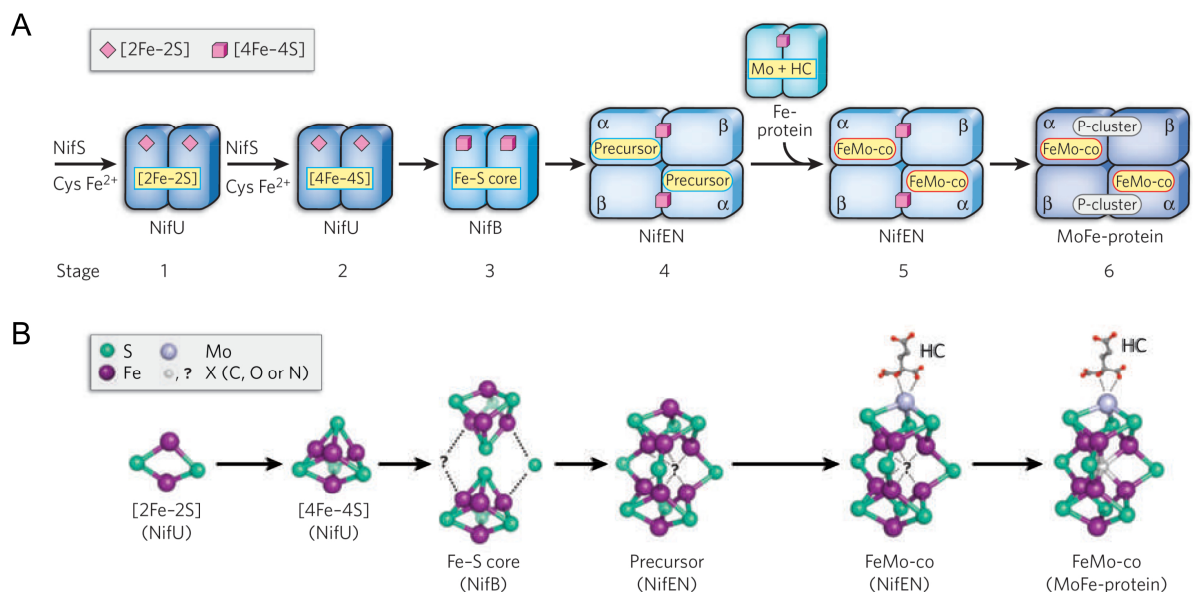


Abbildung 4-5: Biosynthese des Eisen-Molybdän-Kofaktors (FeMoCo) von Nitrogenase (aus Schwarz et al. 2009)

(A) Darstellung der schrittweisen Assemblierung des FeMoCo. Die Biosynthese vollzieht sich an verschiedenen „Plattformen“ in der Reihenfolge NifU-NifS → NifB → NifEN → MoFe-Protein. NifS und NifU generieren kleine Fe-S Fragmente auf NifU (Schritt 1 und 2), welche schließlich zur Erzeugung eines großen Fe-S - Kerns (K-Cluster) auf NifB genutzt werden (3). Dieser Cluster wird zu einer Molybdän-freien Vorstufe (8 Fe-Kern / L-Cluster) prozessiert und auf NifEN übertragen (4). Das Fe-Protein NifH vermittelt die Insertion von Mo und Homocitrat, wodurch der vollständige FeMoCo (M-Cluster) entsteht (5). Nach vollständiger Assemblierung wird dieser schließlich von NifEN auf das MoFe - Protein (NifDK) übertragen. Die permanenten Metallzentren der Nif-Proteine sind pink, die Cluster-Zwischenstufen gelb dargestellt. HC, Homocitrat.

(B) Strukturen der verschiedenen Intermediate während der FeMoCo-Assemblierung. Gezeigt sind die unterschiedlichen Cluster-Typen auf NifU, NifB, NifEN und dem MoFe-Protein NifDK. NifB verbrückt zwei [4Fe-4S]-Cluster durch Insertion von S und einem weiteren Zentralatom X (höchstwahrscheinlich N). Hierdurch entsteht ein Cluster, welcher in seiner Kernstruktur bereits eine starke Ähnlichkeit zum vollständig assemblierten FeMoCo aufweist (Schwarz et al. 2009; Fay et al. 2010).

Durch Charakterisierung der CO-Dehydrogenase der *coxD*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 konnte gezeigt werden, dass sich die Reifung des bimetallischen Clusters am bereits inserierten Moco vollzieht. Das Mutanten-Enzym weist ein [MoO₃]-Ion im aktiven Zentrum auf, welches als Ausgangspunkt der Reifung angesehen werden kann und enthält nahezu keinen cyanolysierbaren Schwefel (Pelzmann et al. 2009). Die Analysen der CO-Dehydrogenase aus der *coxE*-Mutante (durch Dr. A. Pelzmann, Lehrstuhl Mikrobiologie, Universität Bayreuth) und aus der *coxF*-Mutante zeigen, dass beide Apo-Enzyme cyanolysierbaren Schwefel zu 2,0 mol (*coxE*) bzw. 1,40 mol (*coxF*) pro mol Enzym enthalten, aber Cu-defizient sind. Dies bestätigt die bereits von Gnida et al. (2003), Pelzmann et al (2009) sowie Maisel et al. (2012) beschriebene Rolle von CoxD bei der Inkorporation des cyanolysierbaren Schwefels. Die Funktion von CoxD zeigt sich damit anhand der arretierten Enzyme der *coxE*- und *coxF*-Mutante. Translationsanalysen (Kap. 3.7, Abb. 3-8, Tab. 3-5; Kap. 3.9, Abb. 3-10 und 3-16) der Polypeptide CoxD, CoxE und CoxF zeigten, dass die Expression von CoxE das Vorhandensein von CoxF erfordert und umgekehrt. Als Konsequenz fehlen in den Mutantenstämmen E::km und F::km beide Polypeptide (CoxE und CoxF), was dazu führt, dass die Mutante F::km den Phänotyp der Mutante E::km aufweist und in beiden Stämmen CO-Dehydrogenasen mit ähnlichen Eigenschaften gebildet werden. Während für das Präparat der *coxD*-Mutante ein reine [MoO₃]-Spezies gefunden werden konnte (Pelzmann et al. 2009), enthalten die Präparate der *coxE*- und *coxF*-Mutante drei verschiedene Typen an Metallclustern: Die Hauptspezies ist ein [Mo^{VI}(=O)₂OH₍₂₎], gefolgt von einem Persulfid der Form [Mo^V(=O)OH₍₂₎SSH] und einem [Mo^{VI}(=O)OH₍₂₎SH], welches den kleinsten Anteil ausmacht, aber die für die weitere Assemblierung des bimetallischen Clusters relevante Spezies darstellt (vgl. Kap. 3.15, Abb. 3-25 und Kap. 3.21). Die Inhomogenität von Präparaten von CO-Dehydrogenase des Wildtyps von *O. carboxidovorans* OM5 im Zuge des Vorkommens von Biosynthese-Vorstufen wurde bereits von Gnida et al. (2003) und Resch et al. (2005) beschrieben und verdeutlicht die schrittweise Assemblierung des Metall-Clusters. Die über Rekonstitutionsexperimente und über ESR ermittelten hohen Anteile an [Mo^{VI}(=O)₂OH₍₂₎]-Spezies können auf das Fehlen von

CoxF zurückgeführt werden. Das Polypeptid besitzt am N-Terminus ein XdhC-Motiv sowie eine XdhC Rossmann - Domäne (Kap. 3.1, Abb. 3-1). Sequenz-Alignments von CoxF und XdhC aus *R. capsulatus* ergaben 39,6 % Identität für das N-terminale Motiv sowie 20,7 % Identität für letztere Domäne. Die Ähnlichkeit beider Polypeptide betrug 86 %. In *R. capsulatus* kommt XdhC als weitere Aufgabe die Stabilisierung der sulfurierten Form von Moco zu (Neumann et al. 2006). In der Abwesenheit von XdhC wird eine inaktive XDH gebildet. Diese enthält zwar den Molybdän-Kofaktor, aber der terminale Schwefel-Ligand fehlt. XdhC verhindert den Austausch des Schwefelliganden gegen Sauerstoff und stellt sicher, dass nur die sulfurierte Form in XDH inkorporiert wird. Neumann et al. (2006) konnten zeigen, dass die nicht-sulfurierte Form nur unspezifisch in Gegenwart hoher Moco-Konzentrationen inseriert wird. In Analogie kann vermutet werden, dass CoxF den Sulfido-Liganden des Molybdäns in CO-Dehydrogenase vor oxidativen Prozessen schützt. Das Fehlen der CoxF-Funktion in den Mutanten E::km und F::km führt demnach zum Verlust des cyanolysierbaren Schwefels aus $[\text{Mo}^{\text{VI}}(=\text{O})\text{OH}_2\text{SH}]$ - Spezies und zur Bildung von $[\text{Mo}^{\text{VI}}(=\text{O})_2\text{OH}_2]$. Das Vorhandensein von Molybdän (Kap. 3.13, Tab. 3-9) schließt aus, dass CoxF wie XdhC in *R. capsulatus* an der Insertion des Moco in das vollständig gefaltete Enzym beteiligt ist. Es kann aber spekuliert werden, dass die Insertion in den Aufgabenbereich von CoxI fällt. Dieses Polypeptid zeigt wie CoxF große Ähnlichkeiten zu XdhC (84 %) und ist bislang nicht näher charakterisiert worden. Dennoch kann auch bei CoxI im N-terminalen Bereich (Aminosäuren 19 - 74) ein Motiv der XdhC-Familie mit 30,4 % Identität, sowie C-terminal (Aminosäuren 154 - 295) eine XdhC Rossmann - Domäne mit 25,2 % Identität gefunden werden.

Neben der Trioxo- und einfach-sulfurierten Form kann in den CO-Dehydrogenasen der *coxE*- und *coxF*-Mutante eine persulfidische Spezies gefunden werden, die im ESR ein paramagnetisches Mo(V)-Signal zeigt (Kap. 3.21, Abb. 3-42). Diese Spezies kann als das Resultat eines „unproduktiven“ Biosynthese-Weges angesehen werden, welcher bei Fehlen der CoxE/CoxF-Funktionen eingeschlagen wird. Im Gegensatz zum $[\text{Mo}^{\text{VI}}(=\text{O})\text{OH}_2\text{SH}]$ scheint die $[\text{Mo}^{\text{V}}(=\text{O})\text{OH}_2\text{SSH}]$ -Form gegenüber oxidativen Prozessen, welche zum Verlust des cyanolysierbaren Schwefels führen, wesentlich stabiler zu sein. Die Unterbrechung des Biosynthese-Weges des aktiven Zentrums auf Stufe des $[\text{Mo}^{\text{VI}}(=\text{O})\text{OH}_2\text{SH}]$ im Falle des Fehlens von CoxE und CoxF lässt darauf schließen, dass beiden Polypeptiden eine Funktion bei der Inkorporation des Cu zukommt. Findet der Cu-Einbau nicht statt, so kommt es zum Verlust des Schwefels im $[\text{Mo}^{\text{VI}}(=\text{O})\text{OH}_2\text{SH}]$ -Zentrum oder zur weiteren Sulfurierung zum $[\text{Mo}^{\text{V}}(=\text{O})\text{OH}_2\text{SSH}]$.

4.7 Modell der Reifung des [CuSMoO₂]-Clusters und Funktionen der Polypeptide CoxD, CoxE und CoxF

In der *coxG*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 wird ein aktives, vollständig assembliertes Enzym synthetisiert, welches sowohl im Gehalt an Kofaktoren als auch im Gehalt an Schwefel und Kupfer komplett ist (Kap. 3.13; Hager 2011). Somit kann für die entsprechende CO-Dehydrogenase ein [Mo(=O)OH-S-Cu-S-Cys]-Cluster im aktiven Zentrum angenommen werden. Auf dem Niveau von *coxG* scheint daher die Reifung des Clusters abgeschlossen zu sein. Für die Inkorporation von Schwefel und Kupfer in das [Mo^{VI}(=O)₂OH₍₂₎]-Apo-Enzym scheinen deshalb die Polypeptide CoxD, CoxE und CoxF eine zentrale Rolle zu spielen. CoxD kann dabei wie bereits erwähnt eine Funktion bei der Sulfurierung zugeschrieben werden (Pelzmann et al. 2009; Maisel et al. 2012). Voraussetzung für den Sulfurierungsschritt ist zunächst die Reduktion von [Mo^{VI}(=O)₂OH₍₂₎] zu [Mo^V(=O)₂OH₍₂₎]. Da es sich bei dem AAA+-ATPase Chaperon CoxD um ein membrangebundenes Protein handelt (Maisel et al. 2012), kann angenommen werden, dass das für diesen Reduktionsschritt notwendige Elektron aus dem Elektronen-Transport-System (ETS) der Membran stammt. Bei der chemischen Rekonstitution übernimmt das im Sulfurierungsansatz vorhandene Dithionit diese Funktion und überträgt ein Elektron auf das Molybdän, so dass durch Sulfid der äquatoriale Oxo-Ligand durch einen Sulfido-Liganden ersetzt wird. Der Ligandenaustausch am Molybdän ist dabei nicht auf Sulfid beschränkt. Über ESR-spektroskopische Untersuchungen sowie Analysen einer möglichen Cu-Rekonstituierbarkeit konnte veranschaulicht werden, dass unter Dithionit-reduzierenden Bedingungen auch R-SH-Komponenten wie β -Mercaptoethanol und L-Cystein an das Molybdän gebunden werden können (Kap. 3.21; Abb. 3-40, B) und diese somit problemlos den Substrat-Kanal von CO-Dehydrogenase passieren können. Die MgATP-abhängige Sulfurierung des [Mo^V(=O)₂OH₍₂₎] *in vivo* durch CoxD resultiert in einem [Mo^V(=O)OH₍₂₎SH]-Zentrum. Ob eine NifS-ähnliche Schwefeltransferase dabei eine Rolle spielt oder CoxD selbst den Schwefel-Transfer katalysiert, ist unbekannt, ebenso wie die Schwefelquelle. Jedoch können auch hier Verbindungen wie L-Cystein oder Thiosulfate als Schwefel-Donoren in Betracht gezogen werden (Neumann und Leimkühler 2011). Im Zuge einer Desulfurierungsreaktion könnte dabei am Enzym selbst ein Persulfid-Intermediat erzeugt werden, von welchem der Schwefel schließlich übertragen wird (Zheng et al. 1994).

Die Bedingungen der chemischen Rekonstitution des aktiven Zentrums (Kap. 3.15, Abb. 3-25) als auch ESR-Analysen (Kap. 3.21, Abb. 3-41, Tab. 3-15) haben gezeigt, dass sich

die Inkorporation des Cu(I) an einem $[\text{Mo}^{\text{VI}}(=\text{O})\text{OH}_2\text{SH}]$ - Zentrum vollzieht. Es kann daher auch *in vivo* davon ausgegangen werden, dass die Oxidationsstufe +VI des Mo Voraussetzung für den Cu-Einbau ist. Somit würde nach dem Sulfurierungsschritt das aktive Zentrum reoxidiert werden. Die Cu-Defizienz in CO-Dehydrogenase-Präparaten der *coxE*-Mutante (Dr. A. Pelzmann, persönliche Mitteilung) und der *coxF*-Mutante (Kap. 3.13, Tab. 3-9) zeigt, dass die entsprechenden Genprodukte beide an der Cu-Inkorporation beteiligt sein müssen. CoxF könnte dabei eine zentrale Rolle bei der Cu-Mobilisierung und -Bereitstellung einnehmen. So weist die Sequenz von CoxF am C-Terminus ein Histidin-Acid-Phytase Motiv ($\text{R}^{266}\text{HGQRQS}$) und eine Cu-Bindestelle ($\text{M}^{107}\text{CPSHGTM}$) auf (Kap. 3.1, Abb. 3-1). Phytat bzw. Phytinsäure gilt als Chelator bivalenter Kationen (Yao et al. 2012), wobei Cu^{2+} mit höchster Affinität gebunden wird (Evans und Martin 1988). Ein vollständig phosphoryliertes Phytinsäure-Molekül kann dabei 6 Cu^{2+} - Ionen komplexieren. Phytasen sind in der Lage Orthophosphate hydrolytisch freizusetzen, was gleichzeitig in der Freisetzung der gebundenen Kationen resultiert (Yao et al. 2012). Der Vergleich der Profile von Saccharosedichtegradienten von Extrakten des Wildtyps und der *coxF*-Mutante lässt auf eine Orthophosphat-hydrolysierende Aktivität von CoxF schließen (Kap. 3.27, Abb. 3-48), ebenso auch die Aktivitätsprofile in Gelfiltrationsexperimenten von rekombinant gebildetem CoxF (Kap. 3.27, Abb. 3-49). In *O. carboxidovorans* könnte das lösliche CoxF auf diese Weise Cu-Ionen freisetzen und durch die eigene Cu-Bindestelle komplexieren. Durch das VWA-Bindemotiv R^{200}GD auf der CoxF-Sequenz (Kap. 3.1, Abb. 3-1) kommt es zur Interaktion des $[\text{CoxF-Cu}^{2+}]$ mit dem membrangebundenen CoxE, welches eine VWA-Domäne trägt (Kap. 4.1, Abb. 4-1). Im Zuge dessen wird an der Membran ein CoxE- $[\text{CoxF-Cu}^{2+}]$ -Komplex gebildet, innerhalb dessen Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Elektronen des Elektronen-Transport-Systems reduziert wird. Das auf CoxF ermittelte Cu-Bindemotiv entspricht in seiner Sequenz jenem blauer Kupferenzyme, welche Cu^{2+} -Ionen binden. Die Reduktion des CoxF-gebundenen Cu könnte zu einer Destabilisierung der Bindung führen, was die Inkorporation des Cu^{1+} in das $[\text{Mo}^{\text{VI}}(=\text{O})\text{OH}_2\text{SH}]$ -Zentrum ermöglicht und in einem vollständig assemblierten bimetallischen Cluster resultiert. Sequenzanalysen des Integrins CoxE zeigen ein sog. MIDAS-Motiv (metal-ion-dependent adhesion site) (Dr. A. Pelzmann, persönliche Mitteilung), welches in der Ligandenbindestelle lokalisiert ist (Kap. 4.1, Abb. 4-1). Zudem wird angenommen, dass CoxE einen intermediären Komplex mit einem Kation und CoxF eingeht. Welche Art von Kationen dabei eine Rolle spielen und ob Cu hierbei eine Bedeutung hat, ist noch unbekannt.

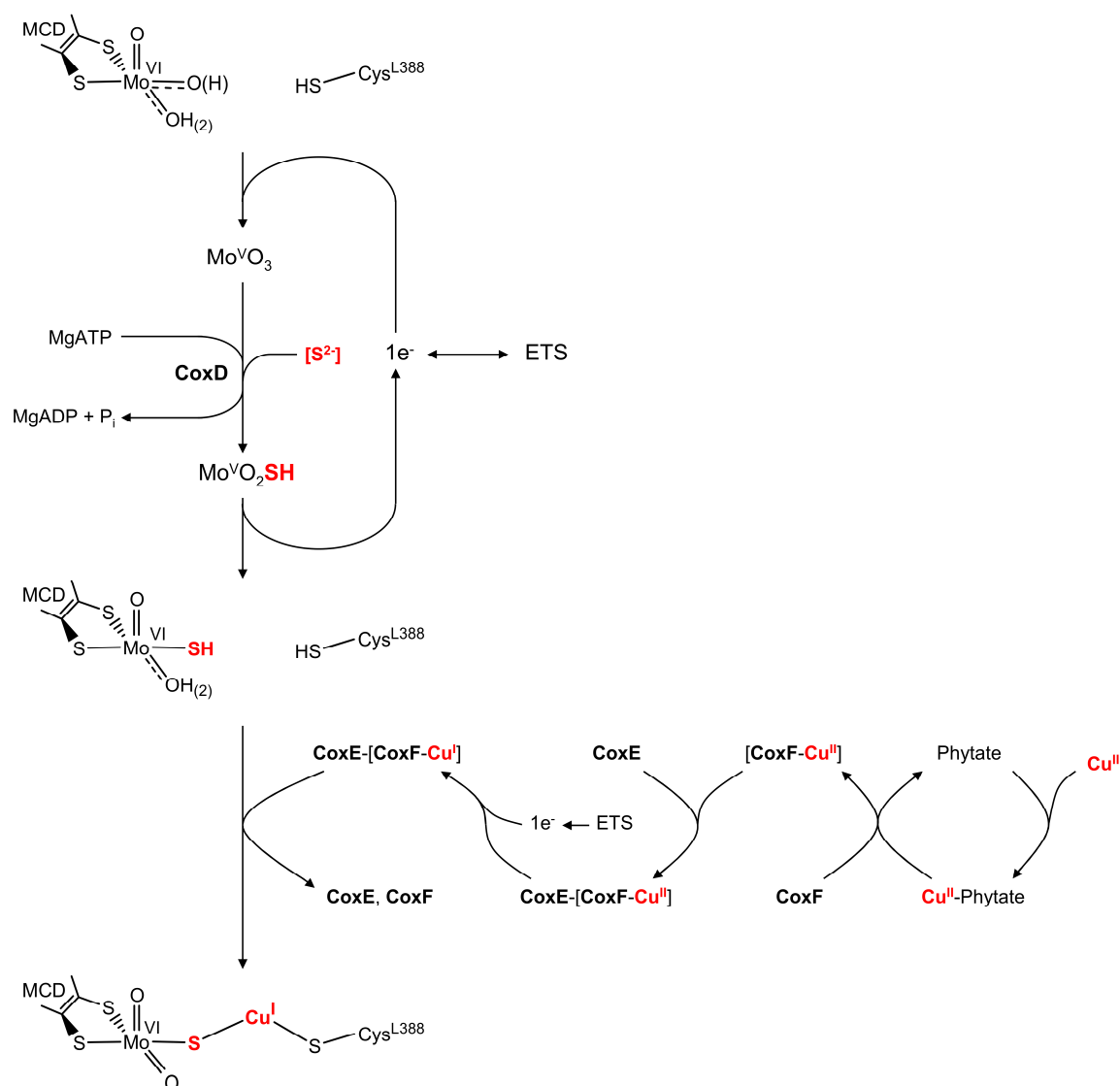


Abbildung 4-6: Modell der Reifung des bimetallichen Clusters im aktiven Zentrum von CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* OM5 (aus Pelzmann et al. 2014).

Das Biosynthese-Modell der Reifung des $[\text{CuSMoO}_2]$ -Clusters geht von einem $[\text{Mo}^{\text{VI}}(\text{=O})_2\text{OH}_{(2)}]$ -Ion im aktiven Zentrum der vollständig gefalteten CO-Dehydrogenase aus und verdeutlicht die Funktionen der Polypeptide CoxD , CoxE und CoxF . Das membrangebundene AAA+-ATPase Chaperon CoxD wird benötigt für den Sulfurierungsschritt und führt zur Erzeugung eines $[\text{Mo}^{\text{VI}}(\text{=O})\text{OH}_{(2)}\text{SH}]$ -Zentrums. Cytoplasmatisches CoxF setzt mittels Phytase-Aktivität Phytat-gebundene Cu^{2+} -Ionen frei und komplexiert diese mittels seines Cu-Bindemotivs. Durch VWA-Interaktionen bilden $[\text{CoxF-Cu}^{2+}]$ und das membrangebundene CoxE einen Komplex, wodurch CoxF Zugang zum Elektronen-Transport-System der Membran erhält. Das CoxF -gebundene Cu^{2+} wird zu Cu^{1+} reduziert, welches schließlich in das $[\text{Mo}^{\text{VI}}(\text{=O})\text{OH}_{(2)}\text{SH}]$ -Zentrum inkorporiert wird und den $[\text{Mo}(\text{=O})\text{OH-S-Cu-S-Cys}]$ -Cluster vervollständigt. Die Oxidationszustände des Molybdäns in den verschiedenen Zwischenstufen ergeben sich aus ESR-spektroskopischen Betrachtungen, die Funktionen der Proteine CoxE und CoxF aus bioinformatischen Analysen der jeweiligen Sequenzen und der Charakterisierung von CO-Dehydrogenasen entsprechender Insertionsmutanten.

4.8 CoxG fungiert als Membran-Anker für CO-Dehydrogenase

Bioinformatische Sequenz-Analysen sagen für CoxG eine hydrophobe Liganden-Bindestelle der SRPBCC-Superfamilie (START/RHO_alpha_C/PITP/Bet_v1/CoxG/CalC) voraus. Darüber hinaus ergaben Sequenzvergleiche 62 % Ähnlichkeit und 13 % Identität zwischen CoxG und der humanen Pleckstrin 2 - Domäne. Bei PH-Domänen (pleckstrin homology domain) handelt es sich um etwa 100 konservierte, verstreut liegende Aminosäure-Reste. PH-Domänen können hauptsächlich in eukaryontischen Proteinen gefunden werden und erfüllen Aufgaben im Bereich der Signaltransduktion sowie bei der Interaktion mit zellulären Membranen oder dem Cytoskelett (Lemmon 2004, 2008). So sind sie in der Lage Phosphatidylinositol-Membranlipide und/oder Membranproteine zu binden und somit die Lokalisation von Protein festzulegen.

Die Inaktivierung von *coxG* durch Insertion einer Kanamycin-Resistenzkassette beeinflusste das CO-chemolithoautotrophe Wachstum nur insofern, dass die Generationszeit erheblich anstieg (Kap. 3.10, Abb. 3-17). Das entsprechende CO-Dehydrogenase-Präparat war vollständig assembliert und katalytisch aktiv (Kap. 3.13; Hager 2011), was verdeutlicht, dass das *coxG*-Genprodukt nicht an der Reifung des bimetallischen Zentrums beteiligt ist. Vielmehr kann aufgrund der PH-Domäne auf der CoxG-Sequenz und der beeinträchtigten Nutzung von CO als Substrat für chemolithoautotrophes Wachstum davon ausgegangen werden, dass CoxG eine Rolle bei der Rekrutierung cytoplasmatischer CO-Dehydrogenase zur Innenseite der Cytoplasma-Membran spielt. Auf diese Weise würde dann der Transfer von Elektronen aus der CO-Oxidation über den FAD-Kofaktor zum Chinon-Pool (Wilcoxon et al. 2011b) und zur Atmungskette gewährleistet werden (Cypionka und Meyer 1983). Die Abwesenheit membrangebundener CO-Dehydrogenase in Extrakten der *coxG*-Mutante unterstützt diese Annahme (Fuhrmann et al. 2003).

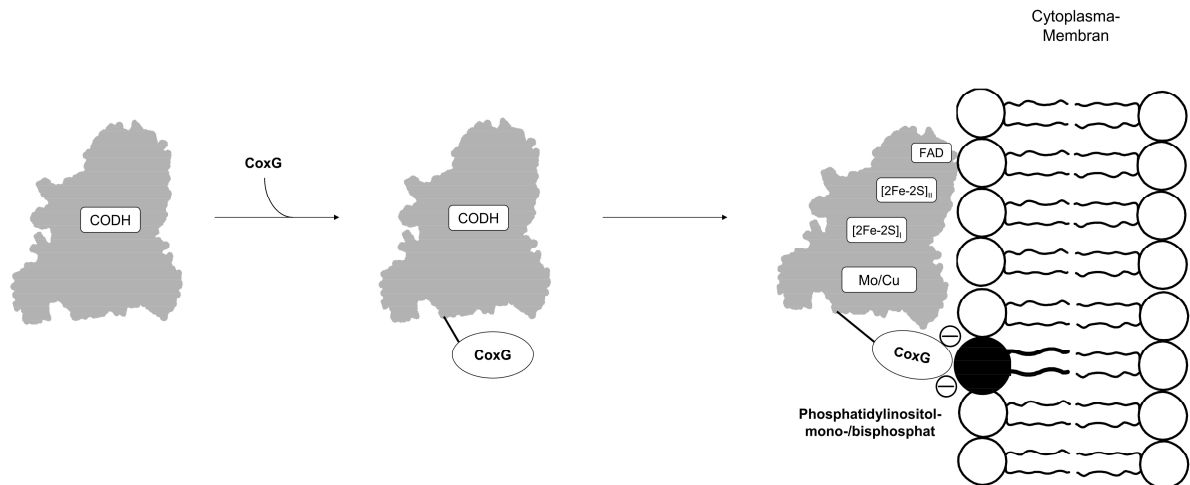


Abbildung 4-7: Modell zur Rekrutierung löslicher CO-Dehydrogenase zur Cytoplasma-Membran mittels CoxG.

Die Charakterisierung der CO-Dehydrogenase aus der *coxG*-Mutante von *O. carboxidovorans* OM5 ergab, dass die Reifung des bimetallischen Zentrums auf dem Niveau von CoxG abgeschlossen ist. Die Mutante enthielt ein vollständig assembliertes, katalytisch kompetentes Enzym. Sequenz-Analysen sagen für CoxG eine PH-Domäne (pleckstrin homology domain) voraus (62 % Ähnlichkeit), welche dem Polypeptid eine Funktion bei der Rekrutierung von CO-Dehydrogenase an die Cytoplasma-Membran zuschreiben könnte. Die Fähigkeit CO als alleinige Energie- und Kohlenstoffquelle zu nutzen, ist in der *coxG*-Mutante gegenüber dem Wildtyp von *O. carboxidovorans* OM5 beeinträchtigt, was auf eine unzureichende Interaktion der cytoplasmatischen CO-Dehydrogenase mit der Membran zurückgeführt werden kann. So kann vermutet werden, dass CoxG die CO-Dehydrogenase im Cytoplasma bindet und diese durch gleichzeitige Interaktion mit Phosphatidylinositol-Membranlipiden mit der Membran in Kontakt bringt.

4.9 Rekombinantes CoxF lässt sich in Form von Einschlusskörpern effektiv anreichern, ist nach der Rückfaltung aber instabil

CoxF wird in *O. carboxidovorans* OM5 im Vergleich zur CO-Dehydrogenase nur in geringen Mengen produziert. Nach Auftrennung cytoplasmatischer Fraktionen über denaturierende PAGE konnte das CoxF-Polypeptid nur nach anschließendem Immunoblot mittels spezifischer IgG-Antikörper detektiert werden (vgl. Kap. 3.6, Abb. 3-7; Kap. 3.7, Abb. 3-8 und Kap. 3.8, Abb. 3-9). Mit *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 stand ein rekombinanter Organismus zur Verfügung, der es erlaubte, CoxF in großen Mengen überzuexprimieren. Das Polypeptid wurde nach IPTG-Induktion löslich als auch in Form von Einschlusskörpern gebildet und machte 32,4 % des gesamten Zellproteins aus (Kap. 3.3; Abb. 3-4, B und Kap. 3.4, Abb. 3-5).

Versuche, das löslich gebildete CoxF aufzureinigen, schlugen weitestgehend fehl, da sich das Protein als instabil herausstellte und während der diversen Aufreinigungsschritte präzipitierte. Aus diesem Grund wurde CoxF in Einschlusskörpern angereichert, rückgefaltet und charakterisiert.

Die Bildung von Einschlusskörpern ist bei rekombinanten Organismen in den meisten Fällen auf hohe Expressionsraten zurückzuführen, welche es dem Protein nicht erlauben, seine natürliche Konformation einzunehmen (Lilie et al. 1998; Burgess 2009). Zwar wurde im verwendeten *E. coli* - Stamm das Thioredoxin-Reduktase-Gen durch Insertion einer Kanamycin-Resistenzkassette inaktiviert, so dass die leichtere Ausbildung von Disulfid-Brücken ermöglicht wird, doch konnte gezeigt werden, dass homologes CoxF aus *O. carboxidovorans* keine inter- oder intramolekularen Disulfid-Brücken ausbildet (Kap. 3.6, Abb. 3-7). Eine fehlerhafte oder unvollständige Faltung kann als eine der Hauptursachen für die Bildung von Einschlusskörpern angeführt werden. Bevor ein Protein seine natürliche Konformation einnimmt, kommt es zur Ausbildung von intermediären Faltungszuständen. Diese weisen häufig nach außen exponierte, hydrophobe Regionen auf, die im nativen Protein später nach innen gerichtet sind. Bei einer hohen Proteinkonzentration können diese Bereiche allerdings zur Interaktion und damit zur Aggregation des rekombinanten Proteins führen (Prouty und Goldberg 1972; Prouty et al. 1975; Burgess 2009).

Das Fehlen von eventuellen Chaperonen, Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerasen, prosthetischen Gruppen oder Kofaktoren im heterologen Expressionssystem kann als weitere Ursache für eine unvollständige oder fehlerhafte Faltung des Proteins angeführt werden (Prouty und Goldberg 1972; Prouty et al. 1975). Häufig lässt man daher Chaperone wie GroEL, GroES, DnaK oder HtpG mit dem rekombinanten Protein koexprimieren, da diese Faltungshelfer evolutionär stark konserviert sind und in nahezu allen Organismen vorkommen. So konnte beispielsweise der lösliche Anteil des humanen Wachstumsfaktors HGF in *E. coli* durch Koexpression von DnaK um 87 % gesteigert werden (Blum et al. 1992).

Die Bildung von Einschlusskörpern wurde auch bei der heterologen Expression von CoxL, CoxM, CoxS, CoxD und CoxE beobachtet. Selbst bei Absenkung der Wachstumstemperatur auf 20 °C (zur Verringerung der hydrophoben Interaktionen, Wilkinson und Harrison 1991) war es nicht möglich, CoxL und CoxM vollständig löslich überzuexprimieren (Wastl 1996; Gremer 2000). Rekombinantes CoxS, CoxD und CoxE erschienen gänzlich in Einschlusskörpern (Schübel 1996; Maisel 2012; Dr. A. Pelzmann, persönliche Mitteilung).

Zur Isolierung von Einschlusskörpern kann genutzt werden, dass diese im Rahmen eines Zellaufschlusses nicht zerstört werden und sich durch niedertourige Zentrifugation leicht abtrennen lassen. Dennoch weisen die Einschlusskörper nach Zentrifugation häufig Kontaminationen in Form von Membran-Resten auf, welche u. U. auch Proteasen enthalten können. Nicht selten müssen Einschlusskörper daher mit Detergentien oder Chelatoren gewaschen werden. CoxF konnte in *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 in Einschlusskörpern bis auf 91 % angereichert werden (Kap. 3.22, Abb. 3-43, Tab. 3-17). Da derartige Proteinaggregate durch starke, nicht-kovalente Kräfte zusammengehalten werden, ist es in der Regel notwendig, das Protein zunächst zu denaturieren, um es in Lösung zu bringen (Burgess 2009). Im Anschluss wird das Protein schrittweise renaturiert, was allerdings die Gefahr birgt, dass große Anteile als unlösliches Präzipitat ausfallen können. Die Solubilisierung von CoxF erfolgte in Anlehnung an die Solubilisierung von rekombinatem CoxD durch Maisel et al. (2012) nach der Methode von Lin (2000). Der Prozess erfolgte durch Zugabe von 8 M Harnstoff in einem alkalischen Milieu, da dieses die Ausbildung von Sekundärstrukturen begünstigt. In 24-stündigem Abstand wurde der pH-Wert jeweils um 0,2 Einheiten gesenkt, bis zu einem finalen Wert von 8,0. Dies diente dazu, dem Protein die Rückfaltung in eine energetisch günstige Konformation zu ermöglichen.

Mittels Circular-Dichroismus-Spektroskopie wurde der Gehalt an Sekundärstruktur-Elementen des rückgefalteten CoxF ermittelt (Kap. 3.24, Abb. 3-44). Die dabei festgestellten Anteile an α -Helices, β -Faltblättern, *turns* und ungeordneten Bereichen wichen jedoch stark von den mittels SABLE bioinformatisch vorhergesagten Strukturelementen ab (Kap. 3.24, Tab. 3-18). So konnten nur 5 % α -helikale Anteile mittels CD-Spektroskopie ermittelt werden, der Gehalt an β -Faltblättern lag bei 38 %. Bioinformatisch wurden stattdessen 30 % α -Helices und 18 % β -Faltblätter vorhergesagt. Nur in Bezug auf *turns* und ungeordnete Bereiche korrelierten die Ergebnisse der CD-Messungen (57 %) mit den bioinformatischen Strukturvorhersagen (52 %) (Kap. 3.1, Tab. 3-2). Die Abweichungen der vorhergesagten und der über CD-Spektroskopie ermittelten Sekundärstruktur-Elemente könnten eine Erklärung dafür sein, dass sich das rekombinante, rückgefaltete CoxF-Protein durch eine hohe Instabilität auszeichnete. Das Protein konnte bei 4 °C 48 - 72 h gelagert werden, ehe erste sichtbare Präzipitate auftraten. In Assays zur Bestimmung einer eventuellen Phosphatase-Aktivität (nach Hillmann 1971) kam es bereits vor Substrat-Zugabe zur Präzipitation des Proteins. Die Ursache hierfür könnte der pH-Wert des verwendeten Citratpuffers mit pH 6,5 sein. Nach Rückfaltung befand sich das CoxF-Polypeptid in einem Puffersystem mit pH 8,0 – der pH-Sprung um 1,5 Einheiten könnte somit das Ausfallen erklären. Im Rahmen der

Rückfaltungsprozedur (und des schrittweisen Absenkens des pH-Wertes um jeweils 0,2 Einheiten in 24 h) müsste hier versucht werden, einen finalen pH-Wert von 7,0 oder niedriger einzustellen.

Die Inkubation von CoxF mit einem Cu(I)-Thioharnstoff-Komplex unter anaeroben Bedingungen (entsprechend der Cu-Rekonstitution von CO-Dehydrogenase) oder mit Cu(II) - Lösungen führte bei verschiedenen Endkonzentrationen ebenfalls zur Präzipitation des Proteins. Die Fähigkeit von CoxF, Cu-Ionen zu binden (gemäß des vorhergesagten Cu-Bindemotivs) konnte daher nicht verifiziert werden.

Insgesamt muss daher davon ausgegangen werden, dass das rekombinante CoxF während der Rückfaltung nicht seine natürliche Konformation eingenommen hat. Eine Ursache hierfür könnte eine fehlerhafte Ausbildung von *turns* in der Proteinstruktur sein. Die Aminosäure Prolin spielt hierbei eine entscheidende Rolle (Wilkinson und Harrison 1991). So kann die *cis/trans*-Isomerisierung von Prolin-Resten ein limitierender Faktor bei der Rückfaltung von Proteinen sein (Evans et al. 1987). CoxF weist 17 Prolinreste auf, was einem verhältnismäßig hohen Gehalt von 6,1 % entspricht. Nach Burgess (2009) beträgt die Dauer für die Umlagerung zwischen einer *cis*- und *trans*-Konfiguration ca. 1 min. Für die 17 Prolinreste in CoxF ergeben sich 2^{17} mögliche Konfigurationen, so dass die Zeitintervalle zwischen dem Absenken des pH-Wertes mit 24 h für die Einnahme der idealen Konformation eventuell nicht ausgereicht haben. Es ist fraglich, ob es bei der Vielzahl an Konfigurationen überhaupt eine optimale Rückfaltung möglich gewesen wäre.

Translationsanalysen der Proteine CoxD, CoxE und CoxF in Extrakten von *O. carboxidovorans* OM5 zeigten zudem, dass alle drei Polypeptide Motive der Familie der DEAD-Box RNA-Helikasen aufweisen (Kap. 3.1, Abb. 3-1; Kap. 4.1, Abb. 4-1) und somit Funktionen in ihrer Translation erfüllen. CoxE und CoxF zeigten dabei eine wechselseitige Abhängigkeit. Es kann spekuliert werden, dass diese Abhängigkeit über die Translation hinausgeht und CoxE und CoxF das jeweils andere Polypeptid auch zur Stabilisierung benötigen. Dies könnte die hohe Instabilität des rekombinanten CoxF aus Einschlusskörpern als auch des löslichen, cytoplasmatisch exprimierten Polypeptids erklären. Ein Ansatz zur „Stabilisierung“ könnte in einer Koexpression von CoxE und CoxF in *E. coli* bestehen. Wie auch für das rekombinante CoxF sollte dabei ein Expressionsstamm verwendet werden, der es erlaubt, lösliches rekombinantes Protein zu erhalten. Das gleichzeitige Vorhandensein von CoxE und CoxF im Cytoplasma des rekombinanten Organismus könnte zur gegenseitigen

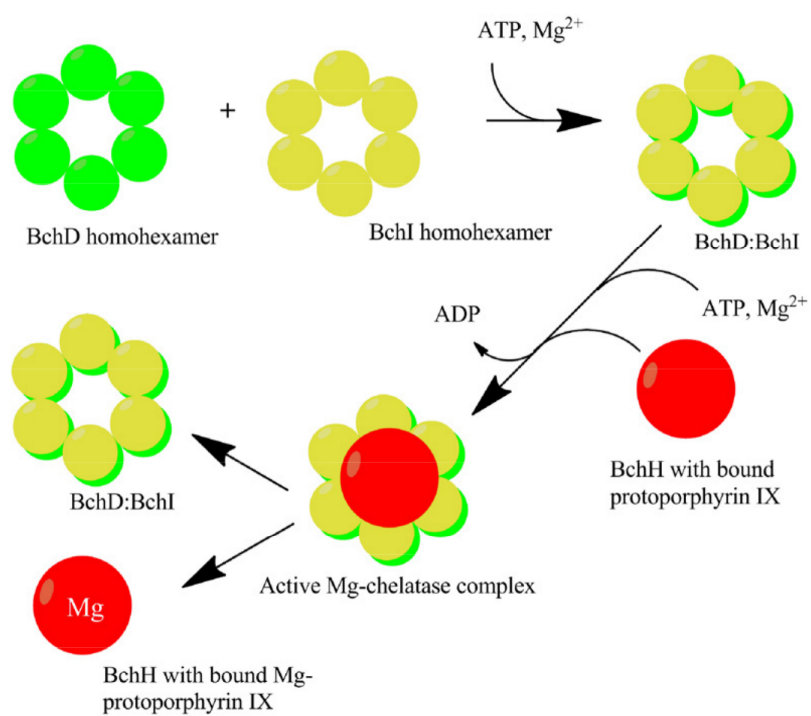
Stabilisierung beider Polypeptide führen. Zudem könnte auf diese Weise eine mögliche Komplexbildung von CoxE und CoxF untersucht werden.

4.10 Oligomerisierung der Cox-Proteine

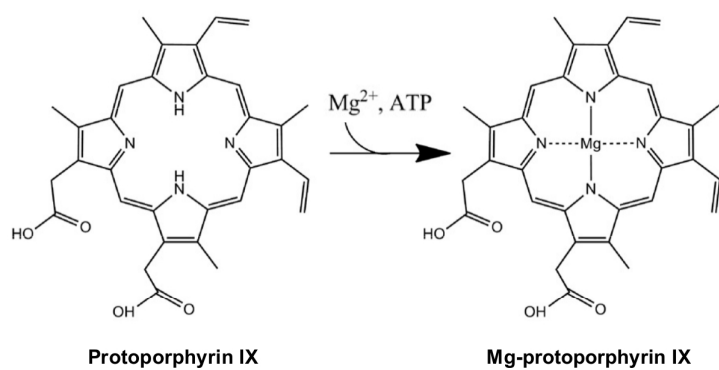
Die Charakterisierung entsprechender CO-Dehydrogenasen aus den Mutantenstämmen *O. carboxidovorans* OM5 D::km (Pelzmann et al. 2009), E::km (Staron 2008) und F::km haben gezeigt, dass die Gene *coxD*, *coxE* und *coxF* Funktionen bei der Assemblierung des [CuSMoO₂]-Clusters besitzen. Zudem sind sie Teil des Subclusters *coxDEFG* und werden gleichermaßen CO-spezifisch exprimiert (Santiago et al. 1999). CoxD ist eine P-loop ATPase der AAA-Proteinfamilie (Pelzmann et al. 2009; Maisel et al. 2012). MgATP-hydrolysierende Aktivität konnte in rekombinantem, rückgefaltetem CoxD nachgewiesen werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das heterolog exprimierte Polypeptid in Form unterschiedlicher oligomerer Zustände (2-mer, 4-mer und 6-mer) vorkommt. Dabei besaßen nur 2-mere und 6-mere ATPase-Aktivität. Ferner konnte beobachtet werden, dass CoxD-Hexamere innerhalb von Wochen zu Dimeren dissoziierten, dieser Prozess durch MgATP innerhalb von Stunden wieder revertiert werden konnte (Maisel et al. 2012). Die Oligomerisierung ist charakteristisch für AAA-Proteine, in vielen Fällen kommt es zur Ausbildung hexamerer Strukturen (Vale 2000). CoxD zeigt in Sequenz und Größe zudem große Ähnlichkeiten zur hexameren, ringförmigen BchI-Untereinheit von Mg-Chelatase (22,0 % Identität zu BchI aus *R. capsulatus*) und besitzt dieselben charakteristischen Schlüsselemente (Maisel et al. 2012). Nicht selten bilden Genprodukte geclusterter Gene funktionelle und strukturelle Einheiten (Roth et al. 1996). Und so zeigt auch CoxE Ähnlichkeiten zu BchD, der nachfolgenden Untereinheit von Mg-Chelatase, und besitzt ebenso eine VWA-Domäne (Dr. A. Pelzmann, persönliche Mitteilung).

Mg-Chelatase spielt eine entscheidende Rolle bei der Biosynthese von Chlorophyll und Bacteriochlorophyll. In *R. capsulatus* kodiert ein 45-kb Gencluster für die relevanten Gene zur Bacteriochlorophyll-Biosynthese (Zsebo und Hearst 1984). Die Genprodukte von *bchI*, *bchD* und *bchH* bilden dabei die Untereinheiten von Mg-Chelatase, welche die Insertion von Mg²⁺ in Protoporphyrin IX katalysiert (vgl. Abb. 4-8) (Willows und Hansson 2003; Lundqvist et al. 2010).

A



B



C

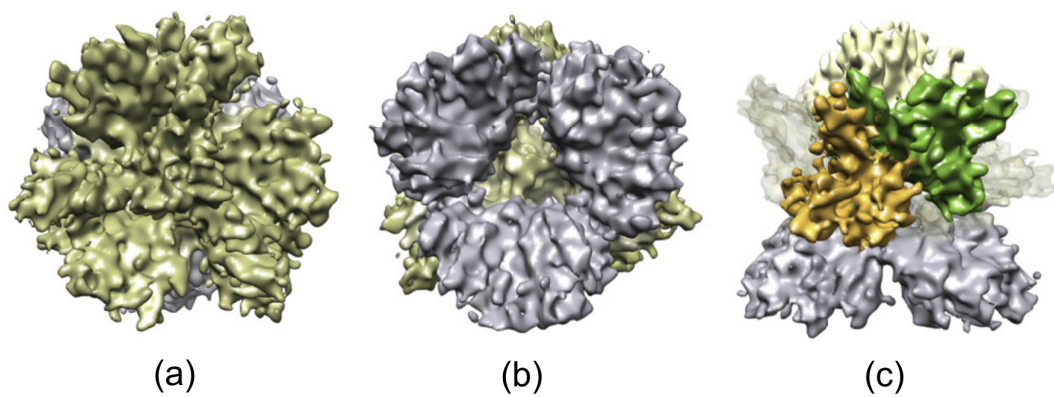


Abbildung 4-8: Assemblierung und katalysierte Reaktion von Mg-Chelatase in *R. capsulatus* (A, B; aus Bollivar 2010) sowie Struktur des BchID-Komplexes in Gegenwart von ADP bei einer Auflösung von 7,5 Å (C; aus Lundqvist et al. 2010).

(A) Die schrittweise Assemblierung von Mg-Chelatase: In Gegenwart von Mg-ATP interagieren Hexamere des AAA+-Proteins BchI und des VWA-Proteins BchD miteinander und bilden eine doppelhexamere Ringstruktur aus, den AAA+-Motorkomplex (Elmlund et al. 2008; Bollivar 2010). Dieser interagiert in Anwesenheit von Mg^{2+} mit BchH, welches das Substrat Protoporphyrin IX gebunden hat. Durch diese Interaktion ergeben sich konformationelle Veränderungen, die zur Aktivierung der ATPase-Aktivität von BchI führen. Im Zuge der ATP-Hydrolyse kommt es zu weiteren Konformationsänderungen, welche schließlich auf BchD übertragen werden und die Insertion von Mg^{2+} in Protoporphyrin IX ermöglichen (Bollivar 2010).

(B) Struktur des Substrats von Mg-Chelatase, Protoporphyrin IX, sowie des Produkts, Mg-Protoporphyrin IX (Bollivar 2010).

(C) Modell des BchID-Komplexes in Gegenwart von ATP (7,5 Å Auflösung), rekonstruiert mittels Cryo-Elektronenmikroskopie und Einzelpartikel-Analyse. Die beiden AAA+-Module der Untereinheiten BchI und BchD bilden jeweils ein Trimer aus Dimeren, wobei die beiden resultierenden Ringstrukturen durch eine Region extensiver Interaktionen getrennt sind. (a) zeigt den Komplex in der Ansicht von oben, der BchD-Ring ist goldfarben dargestellt. In (b) ist der Komplex von unten zu sehen. Die grauen Bereiche stellen den BchI-Ring dar. In der Seitenansicht (c) ist die C-terminale Integrin I - Domäne von BchD zu sehen, mit den Prolin-reichen Regionen in grün und den Regionen saurer Aminosäure-Reste in gelb (Lundqvist et al. 2010).

Für die Aktivität von Mg-Chelatase werden alle drei Untereinheiten sowie auch Mg^{2+} und ATP benötigt (Willows 2003). Zunächst wird in Gegenwart von MgATP der AAA+-Motorkomplex gebildet, welcher aus einem hexameren Ring des AAA+-Proteins BchI sowie einem hexameren Ring des VWA-Proteins BchD besteht (Elmlund et al. 2008; Bollivar 2010). Die Interaktion erfolgt dabei über das VWA-Bindemotiv von BchI und der VWA-Domäne auf BchD. In diesem Doppelring ist nach Fodje et al. (2001) die ATPase-Aktivität zunächst blockiert. BchH, welches wie CoxF aus *O. carboxidovorans* ebenfalls ein VWA-Bindemotiv besitzt, bindet Protoporphyrin IX und interagiert schließlich in Gegenwart von Mg^{2+} mit dem BchI-BchD-Komplex. Durch diese Interaktion ändert sich die Konformation des BchI-BchD-Komplexes, da die VWA-Domäne von BchD nun mit dem VWA-Bindemotiv auf BchH in Wechselwirkung tritt (Fodje et al. 2001). Im Rahmen dieser Konformationsänderung kommt es zur Aktivierung der ATPase-Aktivität von BchI. Die ATP-Hydrolyse führt zu weiteren konformationellen Veränderungen im BchI-Hexamer, welche sich auf den BchD-Ring übertragen und den Einbau von Mg^{2+} in das Protoporphyrin IX ermöglichen (Abb. 4-8, B).

In Analogie wäre denkbar, dass CoxE wie auch CoxD einen hexameren Ring ausbildet und es durch Interaktion des VWA-Bindemotivs auf CoxD mit der VWA/MIDAS-Domäne auf CoxE zur Ausbildung eines Doppelringes kommt. Und auch CoxF, welches abgesehen vom VWA-Bindemotiv keine Ähnlichkeit zu BehH besitzt, könnte oligomere Strukturen oder sogar einen hexameren Ring ausbilden und mit dem CoxD/E-Doppelring über VWA-Wechselwirkungen interagieren.

Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation der Cox-Proteine (Kap. 3.8, Abb. 3-9) und Saccharosedichtegradienten-Zentrifugationen (Kap. 3.9, Abb. 3-10, 3-11, 3-12) zeigten, dass CoxD und CoxE in *O. carboxidovorans* membrangebunden vorkommen, während CoxF löslich vorliegt. Ferner war auch die Oligomerisierung für CoxD, CoxE und CoxF nachweisbar (Tab. 3-6 und 3-7). Maisel et al. (2012) konnten das rekombinante CoxD über einen weiten Massenbereich von 38 bis 343 kDa detektieren. Als oligomere Organisation konnten allerdings 2-mere, 4-mere und 6-mere in einem Verhältnis von 1:1:1 festgestellt werden. Dies konnte für die Extrakte von *O. carboxidovorans* OM5 jedoch nicht ermittelt werden, was aber auch dem Vorliegen als Membran-Protein geschuldet sein kann – und damit einer Assoziation mit Membran-Partikeln, wodurch erhöhte molekulare Massen auftraten. In Saccharosedichtegradienten (Kap. 3.9, Abb. 3-13 und 3-14, Tab. 3-7) konnten für CoxD Oligomere detektiert werden, die von 8-mere zu 22-meren reichten. Dabei kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den höheren molekularen Massen schon um Protein-Aggregate handelt und um keine definierten oligomeren Strukturen. Gleiches gilt für das membrangebundene CoxE-Polypeptid. Nach Freisetzung im Rahmen der Behandlung mit Triton X-100 konnten rechnerisch 9-mere bis 15-mere gefunden werden. CoxD und CoxE wurden in zellfreien Rohextrakten und Membran-Fractionen stets in den gleichen, höheren Dichtebereichen detektiert, was aber auf das Vorliegen als Membranproteine zurückgeführt werden kann und kein direkter Nachweis für eine Interaktion ist. Stattdessen kann die Koinzidenz von CoxE und CoxF im partikulären Bereich zellfreier Extrakte (Kap. 3-9, Abb. 3-10) eher als Hinweis auf die in Kap. 4.7 diskutierte Interaktion beider Polypeptide bei der Reifung von CO-Dehydrogenase gewertet werden.

Die Oligomerisierung von CoxF reicht von 3-meren bis hin zu 25-meren. Die Koinzidenz mit CoxE ergab sich für die oligomeren Zustände des 12-mers, 14-mers und 16-mers. Dennoch muss berücksichtigt werden, dass diese oligomeren Strukturen für CoxF auch im Cytoplasma von *O. carboxidovorans* OM5 zu finden waren, so dass es sich bei der Interaktion von CoxE und CoxF nur um eine transiente Komplexbildung handeln kann.

Die Oligomerisierung von CoxF konnte darüber hinaus auch im rekombinanten System nachgewiesen werden (Kap. 3.25). Obwohl das aus Einschlusskörpern solubilisierte und rückgefaltete CoxF in seinen Sekundärstruktur-Elementen erheblich von der bioinformatischen Vorhersage abwich (Kap. 3.24, Tab. 3-18) und daher von einer fehlerhaften oder teilweise unvollständigen Faltung auszugehen ist (vgl. Kap. 4.9), konnten verschiedene oligomere Formen detektiert werden. Die Hauptform bildeten dabei 4-mere, zusätzlich konnten 2-mere sowie 8- bis 12-mere zu geringen Anteilen gefunden werden (Kap. 3-25, Abb. 3-45, Tab. 3-19). Transmissionselektronenmikroskopische Analysen konnten das Vorliegen von oligomeren Strukturen bestätigen. So zeigten sich Partikel, die klar von Proteinaggregaten abgegrenzt werden konnten und zumeist in einer Größenordnung von 110 bis 130 Å lagen (Kap. 3.25, Abb. 3-46). CO-Dehydrogenase (277 kDa) besitzt zum Vergleich eine Größe von 145 x 100 x 70 Å, die CoxL-Untereinheit (88,7 kDa) eine Größe von 60 x 83 x 70 Å (Dobbek et al. 1999). Sirijovski et al. (2008) konnten mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen den Durchmesser von monomeren BchH-Partikeln zu 100 Å bestimmen. Die molekulare Masse dieses Proteins beträgt 129 kDa. Die exakte Faltung von CoxF ist bisher nicht bekannt. Darüber hinaus kann auch keine Aussage darüber getroffen werden, nach welchem Mechanismus sich die Oligomerisierung vollzieht. Polare oder hydrophobe Aminosäure-Reste können dabei als ‚Hot-Spots‘ dienen und über Wasserstoff-Brückenbindungen oder van der Waals-Wechselwirkungen die Oligomerisierung begünstigen (Clackson und Wells 1995; Bogan und Thorn 1998; Hu et al. 2000). Trotzdem stehen die mittels Dichtegradienten berechneten 4-mere von CoxF nicht mit den über TEM erhaltenen Partikeldurchmessern (110 bis 130 Å) in Widerspruch, wie insbesondere der Größenvergleich mit CoxL und BchH zeigt. Kleinere Partikel (60 Å) könnten zudem dimere Strukturen darstellen, Partikel mit größeren Durchmessern (180 bis 220 Å) lassen sich als 8-mere oder 9-mere interpretieren (Kap. 3.25, Abb. 3-46).

Ein Teil des rekombinanten CoxF wurde im Wirtsorganismus löslich exprimiert (Kap. 3.4, Abb. 3-5). Obwohl sich diese CoxF-Fraktion als sehr labil herausstellte und nicht effektiv aufgereinigt werden konnte, ließen sich verschiedene oligomere Zustände mittels Gelfiltration trennen (vgl. Kap. 3.26, Abb. 3-47, Tab. 3-20). Dabei konnten Monomere als auch 6-mere, 12-mere und 18-mere detektiert werden, wobei sich deutliche Hinweise auf die vorhergesagte Histidin-Phytase-Aktivität zeigten (Kap. 3.27, Abb. 3-49). Die hier ermittelte oligomere Organisation scheint neben dem Monomer das 6-mer als Grundlage zu haben und unterscheidet sich damit von den Oligomerisierungszuständen des rückgefalteten CoxF aus

Einschlusskörpern. Die Ursachen für die unterschiedlichen Oligomerisierungszustände können durchaus experimenteller Natur sein. So können zunächst Faktoren wie die Proteinkonzentration, die Temperatur und der pH-Wert des umgebenden Milieus einen Einfluss ausüben (Nooren und Thornton 2003a). Darüber hinaus kann die Oligomerisierung auch als Reaktion auf einen Stimulus wie z.B. den Phosphorylierungszustand erfolgen. Veränderungen können hier dramatische Effekte auf die Affinität der Untereinheiten zueinander haben (Nooren und Thornton 2003b). Viele Proteine existieren in verschiedenen oligomeren Zuständen, teilweise in einem Gleichgewicht der Zustände untereinander. Sowohl geringe Veränderungen im umgebenden Milieu, als auch in der Proteinkonzentration können dieses Gleichgewicht verschieben und bestimmte oligomere Strukturen bevorzugen (Rochet et al. 2000; Liu et al. 2002; Ali et al. 2003). Die genannten Aspekte können zusätzlich als Erklärung herangezogen werden, warum sich im homologen System in *O. carboxidovorans* OM5 eine andere oligomere Organisation zeigt als im heterologen Expressionssystem.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Rolle des CoxF-Polypeptids im Zusammenhang mit der Reifung des $[\text{CuSMoO}_2]$ -Clusters im aktiven Zentrum von *Oligotropha carboxidovorans* OM5.

Um die Funktion(en) von CoxF bei der posttranslationalen Reifung klären zu können, wurde das Leseraster des *coxF*-Gens durch Insertion einer Kanamycin-Resistenzkassette inaktiviert. Der resultierende Mutantenstamm *O. carboxidovorans* OM5 F::km war nicht mehr in der Lage mit CO als alleinige Energie- und Kohlenstoffquelle chemolithoautotroph zu wachsen, wohingegen die Nutzung von H_2 und CO_2 nicht beeinträchtigt war. Dies zeigt, dass CoxF eine essentielle Funktion im CO-Stoffwechsel besitzt.

Im Zuge der Anzucht mit H_2/CO_2 in Gegenwart von CO als Induktor wird in *O. carboxidovorans* OM5 F::km eine Apo-CO-Dehydrogenase zu einem Anteil von 5,9 bis 6,9 % am Gesamtzellprotein synthetisiert. Das Enzym ist vollständig assembliert in Bezug auf seine Untereinheitenstruktur und besitzt eine funktionelle Elektronentransportkette mit stöchiometrischen Mengen an Mo-MCD, den $[\text{2Fe-2S}]$ -Clustern vom Typ I und II, sowie dem FAD-Kofaktor. Durch Zugabe des artifiziellen Elektronendonors Dithionit konnte gezeigt werden, dass die Kofaktoren redoxaktiv sind. In der *coxF*-Mutante wird eine nahezu inaktive CO-Dehydrogenase gebildet (0,136 U/mg), welche 1,83 mol Mo und 1,40 mol S pro mol Protein aufweist, und Cu-defizient ist (0,045 mol Cu). Dies verdeutlicht, dass sich die Funktion von CoxF auf die posttranslationale Reifung des bimetallischen Clusters bezieht, insbesondere auf die Inkorporation von Cu. Die Biosynthese und Integration der funktionellen Kofaktoren ist von der Mutation nicht betroffen.

Durch Zugabe eines Cu(I)-Thioharnstoff-Komplexes konnte die CO-oxidierende Aktivität des Enzyms der *coxF*-Mutante nur zu 14,2 % wiederhergestellt werden. Die vorherige Behandlung mit Sulfid in Gegenwart von Dithionit stellte 85,6 % der Aktivität wieder her. Hieraus konnte gefolgert werden, dass einerseits der cyanolysierbare Schwefel in einer inkompetenten Form vorliegt, und andererseits, dass ein hoher $[\text{MoO}_3]$ -Anteil im Präparat vorliegen muss.

Mittels ESR und der teilweise erhaltenen paramagnetischen Signale konnte gezeigt werden, dass Schwefelverbindungen wie β -Mercaptoethanol, Sulfid oder L-Cystein an den Sulfido-Liganden des Mo in Cu-defizienten Zentren binden können. Auf diese Weise wurde zunächst bestätigt, dass die Sulfurierung im Zuge der chemischen Rekonstitution nicht von einem Persulfid am Cystein³⁸⁸ ausgeht, sondern zu einem Ligandenaustausch am Mo führt.

Der Austausch einer Oxo- durch eine Sulfido-Gruppe führt zur Bildung eines $[\text{Mo}^{\text{V}}(=\text{O})\text{OH}_{(2)}\text{SH}]$. Die nachfolgende Inkubation mit Schwefelverbindungen erzeugt ein $[\text{Mo}^{\text{V}}(=\text{O})\text{OH}_{(2)}\text{SSR}]$ -Disulfid. ESR-Spektren der CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante zeigten Signale, die auf die Koexistenz verschiedener Spezies im aktiven Zentrum schließen lassen: $[\text{Mo}^{\text{VI}}(=\text{O})_2\text{OH}_{(2)}] > [\text{Mo}^{\text{V}}(=\text{O})\text{OH}_{(2)}\text{SSH}] > [\text{Mo}^{\text{VI}}(=\text{O})\text{OH}_{(2)}\text{SH}]$. Der Hauptanteil (71,4 - 79 %) stellt damit ein Trioxo-Molybdän-Zentrum dar. Der detektierte cyanolysierbare Schwefel verteilt sich auf ein persulfidisches $[\text{Mo}^{\text{V}}(=\text{O})\text{OH}_{(2)}\text{SSH}]$ (14,4 - 18 %) sowie ein $[\text{Mo}^{\text{VI}}(=\text{O})\text{OH}_{(2)}\text{SH}]$ (3 - 14,4 %). Letzteres kann mit Cu(I) zu einem aktiven Enzym rekonstituiert werden.

Sequenzanalysen von CoxF haben gezeigt, dass das Polypeptid ein Motiv der XdhC / CoxI-Familie besitzt. CoxF könnte daher eine Funktion bei der Stabilisierung des Sulfido-Liganden des Mo besitzen. Dies würde den hohen $[\text{Mo}^{\text{VI}}(=\text{O})_2\text{OH}_{(2)}]$ - sowie den niedrigen $[\text{Mo}^{\text{VI}}(=\text{O})\text{OH}_{(2)}\text{SH}]$ -Anteil im Präparat der *coxF*-Mutante erklären. Die Bildung persulfidischer Strukturen stellt dabei einen „unproduktiven“ Biosynthese-Weg dar.

Translationsanalysen zeigten, dass in Extrakten der *coxD*-Mutante weder CoxD, noch CoxE und CoxF detektiert sind. In der *coxE*- und *coxF*-Mutante sind die resultierenden Polypeptide stets gleichzeitig nicht vorhanden. Sequenzanalysen ergaben, dass CoxD, CoxE und CoxF Motive der DEAD-Box RNA-Helikase Familie aufweisen und damit Funktionen für ihre Translation. So erfordert die Translation von CoxE und CoxF das CoxD-Polypeptid, CoxE benötigt CoxF und umgekehrt. Diese Tatsache und experimentelle Befunde verdeutlichten, dass die CO-Dehydrogenase aus der *coxF*-Mutante den Phänotyp der *coxE*-Mutante besitzt und beide Präparate damit ununterscheidbar sind.

CoxF besitzt außerdem ein Von Willebrand Faktor A - Bindemotiv, welches eine Interaktion mit der entsprechenden Bindedomäne auf CoxE ermöglicht, sowie eine für saure Histidin-Phytasen charakteristische Sequenz. Eindeutige Hinweise auf eine derartige Aktivität konnten über Saccharosedichtegradienten erhalten werden. Dass CoxF eine Funktion bei der Inkorporation des Cu-Ions erfüllt, ergibt sich auch aus einem Cu-Bindemotiv, welches dem blauer Kupferenzyme vom Typ 1 entspricht.

So wird in einem Biosynthese-Modell zunächst das $[\text{Mo}^{\text{VI}}(=\text{O})_2\text{OH}_{(2)}]$ -Zentrum reduziert und zum $[\text{Mo}^{\text{V}}(=\text{O})\text{OH}_{(2)}\text{SH}]$ sulfuriert. Dieser MgATP-abhängige Schritt erfordert die Funktion der membrangebundenen AAA-ATPase CoxD. Nach Reoxidation des Mo erfolgt die Cu-Insertion, welche die Polypeptide CoxE und CoxF benötigt. So könnte cytoplasmatisches CoxF Phytat-gebundenes Cu(II) durch die Hydrolyse von Phosphomonoestern freisetzen und schließlich binden. In einem Komplex aus CoxE und

CoxF an der Membran wird das gebundene Cu-Ion zum Cu(I) reduziert und in das aktive Zentrum von CO-Dehydrogenase inseriert.

CoxG erfüllt keine Funktion beim Reifungsprozess. So zeigte ein entsprechender Mutantenstamm CO-chemolithoautotrophes Wachstum, allerdings war die Generationszeit um mehr als das 8-fache gegenüber dem Wildtyp erhöht. In der *coxG*-Mutante wird eine aktive CO-Dehydrogenase gebildet, welche nahezu vollständig in Bezug auf Mo, cyanolysierbaren Schwefel und Cu ist. Dies zeigt, dass die Assemblierung des Metallclusters auf dem Niveau von CoxG abgeschlossen ist. Das Polypeptid scheint dennoch benötigt zu werden, um die cytoplasmatische CO-Dehydrogenase zur Cytoplasma-Membran zu eskortieren. An der Membran vollzieht sich die Oxidation von CO zu CO₂. Die Interaktion von CoxG mit CO-Dehydrogenase und den Phosphatidylinositol-Membran-Lipiden wird über die PH-Domäne auf der Sequenz von CoxG ermöglicht.

Rekombinantes CoxF wurde in *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 löslich als auch in Form von Einschlusskörpern gebildet. Durch die Solubilisierung dieser Einschlusskörper und eine nachfolgende Rückfaltung konnte ein Polypeptid mit einer Reinheit von 91 % erhalten werden. Löslich exprimiertes, rekombinantes CoxF konnte mittels Gelfiltration angereichert werden. In beiden Fällen zeigte sich, dass CoxF oligomere Strukturen ausbildet. Diese Oligomerisierung konnte durch Transmissionselektronenmikroskopie bestätigt werden. So lag das rückgefaltete CoxF überwiegend in Form von 4-meren vor, während das lösliche CoxF Monomere, 6-mere, 12-mere und 18-mere ausbildete. Ähnliche oligomere Organisationen konnten für homologes CoxF auch in Extrakten von *O. carboxidovorans* OM5 mittels Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation erhalten werden.

6 Summary

The present thesis deals with the role of the CoxF polypeptide in the maturation process of the [CuSMoO₂] cluster in the active site of CO dehydrogenase of *Oligotropha carboxidovorans* OM5.

The reading frame of the *coxF* gene was disrupted by the insertion of a kanamycin resistance cassette in order to elucidate the function(s) of CoxF. The mutant strain *O. carboxidovorans* OM5 F::km was impaired in the utilization of CO as the sole source of energy and carbon, whereas the utilization of H₂ and CO₂ was not affected. Thus, CoxF fulfills an essential function in the chemolithoautotrophic CO-metabolism.

Appropriate growth conditions with H₂ / CO₂ in the presence of CO induced the synthesis of an apo - CO dehydrogenase in the mutant strain *O. carboxidovorans* OM5 F::km to an amount of 5.9 to 6.9 % of the total cell protein. The enzyme of the *coxF*-mutant is fully assembled in its subunit organization and exhibits a functional electron transport chain with stoichiometric amounts of Mo-MCD, [2Fe-2S]-clusters I and II and the FAD cofactor. In the presence of the artificial electron donor sodium dithionite, the cofactors are redoxactive. The CO dehydrogenase of the enzyme of the *coxF*-mutant was nearly inactive (0.136 U/mg), reveals 1.83 mol Mo per mol protein, 1.40 mol S and was Cu deficient (0.045 mol). These results indicate that the function of CoxF refers to the posttranslational maturation of the bimetallic cluster, particularly to the incorporation of Cu. Biosynthesis and integration of the functional cofactors are not affected by the mutation.

Employing a Cu(I)-(thiourea) complex, the CO-oxidizing activity of the enzyme preparation of the *coxF* mutant could be restored to only 14.2 %. The prior treatment with sulfide in the presence of dithionite reconstituted 85.6 % of activity. Thus, one can conclude that the cyanolyzable sulfur is of an incompetent type and the enzyme preparation harbors high amounts of [MoO₃].

EPR reveals that sulfur compounds like β-mercaptoethanol, sulfide or L-cysteine are capable of binding to the sulfur ligand of Mo in Cu-deficient centers. Thus it could be confirmed that the sulfuration step in the course of active site reconstitution leads to an exchange of ligands at the Mo and not to a persulfide at the cysteine³⁸⁸. The exchange of an oxygen atom against sulfur generates a [Mo^V(=O)OH₍₂₎SH]. Subsequent incubation with sulfur compounds leads to a [Mo^V(=O)OH₍₂₎SSR] disulfide. EPR of enzyme preparations from the mutant in *coxF* reveals the coexistence of three different types of active sites: [Mo^{VI}(=O)₂OH₍₂₎] > [Mo^V(=O)OH₍₂₎SSH] > [Mo^{VI}(=O)OH₍₂₎SH]. The main species

(71.4 - 79 %) harbors a trioxo molybdenum center. Detectable cyanolyzable sulfur is distributed to a $[\text{Mo}^{\text{V}}(=\text{O})\text{OH}_{(2)}\text{SSH}]$ persulfide (14.4 - 18 %) and a $[\text{Mo}^{\text{VI}}(=\text{O})\text{OH}_{(2)}\text{SH}]$ center (3 - 14.4 %) which can be reconstituted with Cu(I) to an active enzyme.

CoxF reveals an XdhC/CoxI family motif on its sequence. Therefore it can be assumed that CoxF stabilizes the sulfurated Mo-species. This might explain the high proportion of $[\text{Mo}^{\text{VI}}(=\text{O})_2\text{OH}_{(2)}]$ and the low content of $[\text{Mo}^{\text{VI}}(=\text{O})\text{OH}_{(2)}\text{SH}]$ in enzyme preparations of the *coxF*-mutant. The synthesis of persulfids seems to be the result of an unproductive pathway.

Translational analysis indicated that neither CoxD nor CoxE and CoxF are detectable in extracts of *O. carboxidovorans*. The mutants in *coxE* and *coxF* were lacking both the CoxE and CoxF polypeptide. Sequence analysis reveals that CoxD, CoxE and CoxF combine motifs of the DEAD-box RNA helicase family and fulfil functions in their translation. Thus, CoxD is required for the translation of CoxE and CoxF, whereas CoxE is required for the translation of CoxF and *vice versa*. These results and experimental data indicate that the CO dehydrogenase of the mutant in *coxF* has the phenotype of the mutant in *coxE*, and both enzyme preparations are indistinguishable.

Furthermore CoxF carries a Von Willbrand Factor A - binding motif that would allow interaction with the corresponding binding domain on CoxE, and a motif characteristic for histidine acid phosphatases. Sucrose density gradients gave distinct indications for such an activity. A possible function in the incorporation of Cu can be supposed by a Cu-binding motif corresponding to that of type 1 blue copper enzymes.

These data were taken to delineate a model for the biosynthesis of the active site cluster. The first step is the reduction of the $[\text{Mo}^{\text{VI}}(=\text{O})_2\text{OH}_{(2)}]$ center and the subsequent sulfuration, which results in a $[\text{Mo}^{\text{V}}(=\text{O})\text{OH}_{(2)}\text{SH}]$. This MgATP-dependent reaction requires the function of the membrane bound AAA-ATPase CoxD. After reoxidation Cu is inserted requiring the polypeptides CoxE and CoxF. Phytate-bound Cu(II) is released by cytoplasmic CoxF through hydrolysis of phosphate monoesters and transferred to its Cu-binding site. In a complex composed of CoxF and CoxE at the inner aspect of the membrane the Cu-ion is reduced to Cu(I) and inserted into the active site of CO dehydrogenase.

CoxG fulfils no function in this maturation process. The corresponding mutant strain shows CO-chemolithoautotrophic growth, however, the generation time was more than 8-fold increased compared to the wild type. The CO dehydrogenase of the *coxG*-mutant exhibits CO-oxidizing activity and contains the complete set of Mo, cyanolyzable sulfur and Cu. Thus, cluster assembly is completed at the stage of CoxG. However, the polypeptide seems to be required to escort the cytoplasmic CO dehydrogenase to the membrane where the oxidation of

CO to CO₂ takes place. The PH domain on CoxG enables the polypeptide to interact with CO dehydrogenase and phosphatidylinositol membrane lipids.

Recombinant CoxF was expressed in *E. coli* AD494(DE3)/pSL1 as a soluble protein fraction as well as insoluble in inclusion bodies. The latter were solubilized and the protein was refolded yielding CoxF in a purity of 91 %. Soluble expressed, recombinant CoxF could be enriched by gel filtration experiments. CoxF shows different oligomerization states in both cases which could be confirmed by transmission electron microscopy. Solubilized and refolded CoxF exists mainly as 4-mers, whereas the soluble CoxF exists as monomers, 6-mers, 12-mers and 18-mers. Similar oligomerization states could be obtained by sucrose density gradient centrifugation for homologous CoxF in extracts of *O. carboxidovorans* OM5.

7 Literaturverzeichnis

Adamczak, R., Porollo, A. & Meller, J. (2004) Accurate prediction of solvent accessibility using neural networks based regression. *Proteins*, 56, 753-767.

Ali, S. A., Iwabuchi, N., Matsui, T., Hirota, K., Kidokoro, S., Arai, M., Kuwajima, K., Schuck, P. & Arisaka, F. (2003) Reversible and fast association equilibria of a molecular chaperone, gp57A, of bacteriophage T4. *Biophys. J.*, 85, 2606-2618.

Allore, R. J. & Barber, B. H. (1984) A recommendation for visualizing disulfide bonding by one-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 137, 523-527.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25, 3389-3402.

Amara, P., Mouesca, J. M., Volbeda, A. & Fontecilla-Camps, J. C. (2011) Carbon monoxide dehydrogenase reaction mechanism: a likely case of abnormal CO₂ insertion to a Ni-H⁺ bond. *Inorg. Chem.*, 50, 1868-1878.

Auling, G., Busse, J., Hahn, M., Hennecke, H., Kroppenstedt, R., Probst, A. & Stackebrandt, E. (1988) Phylogenetic heterogeneity and chemotaxonomic properties of certain gram-negative aerobic carboxydobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*, 10, 264-272.

Barondeau, D. P. & Lindahl, P. A. (1997) Methylation of carbon monoxide dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum* and mechanism of acetyl - CoA synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 3959-3970.

Behrends, K. (2000) Genetische und biochemische Analyse des Megaplasmid-kodierten *coxG*-Gens und seines Genproduktes aus *Oligotropha carboxidovorans* OM5. *Diplomarbeit, Universität Bayreuth*.

Beisenherz, G., Bolze, H. G., Bücher, T., Czok, R., Garbade, K. H., Meyer-Arendt, E. & Pfeleiderer, G. (1953). Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskel in einem Arbeitsgang. *Z. Naturforsch.*, 8b, 555-557.

Bergmeyer, H. U. (1974) Methoden der enzymatischen Analyse, Band 2, S. 2099. *Verlag Chemie Weinheim*.

Blum, P., Velligan, M., Lin, N. & Matin, A. (1992) DnaK-mediated alterations in human growth hormone protein inclusion bodies. *Biotechnology*, 10, 301-304.

Bogan, A. A. & Thorn, K. S. (1998) Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J. Mol. Biol.*, 280, 1-9.

Bollivar, D. W. (2010) Putting metal in the middle. *Structure*, 18, 277-278.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.

Bray, R. C., George, G. N., Lange, R. & Meyer, O. (1983) Studies by e.p.r. spectroscopy of carbon monoxide oxidases from *Pseudomonas carboxydovorans* and *Pseudomonas carboxydohydrogena*. *Biochem. J.*, 211, 687-694.

Brenner, A. J. & Harris, E. D. (1995) A quantitative test for copper using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 226, 80-84.

Brondino, C. D., Romao, M. J., Moura, I. & Moura, J. J. (2006) Molybdenum and tungsten enzymes: the xanthine oxidase family. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 10, 109-114.

Burgess, B. K. & Lowe, D. J. (1996) Mechanism of molybdenum nitrogenase. *Chem. Rev.*, 96, 2983-3012.

Burgess, R. R. (2009) Refolding solubilized inclusion body proteins. *Method. Enzymol.*, 463, 259-282.

Cardenas, J. & Mortenson, L. E. (1974) Determination of molybdenum and tungsten in biological materials. *Anal. Biochem.*, 60, 372-381.

Carrio, M. M. & Villaverde, A. (2001) Protein composition analysis of inclusion bodies produced in recombinant *E. coli*. *FEBS Lett.* 489, 29-33.

Caruthers, J. M., Johnson, E. R. & McKay, D. B. (2000) Crystal structure of yeast initiation factor 4A, a DEAD-box RNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97, 3080-3085.

Clackson, T. & Wells, J. A. (1995) A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. *Science*, 267, 383-386.

Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E. III, Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J. E., Taylor, K., Whitehead, S. & Barrell, B. G. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393, 537-544.

Compton, L. A. & Johnson, Jr., W. C. (1986) Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. *Anal. Biochem.*, 155, 155-167.

Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N. K. & Linder, P. (2006) The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene*, 367, 17-37.

Coughlan, M. P. (1980) Aldehyde oxidase, xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase: hydroxylases containing molybdenum, iron-sulphur and flavin. In: *Molybdenum and molybdenum containing enzymes* (Coughlan, M. P., ed.), 119-185, Pergamon Press Oxford.

Creighton, T. E. (1997) Protein folding coupled to disulphide bond formation. *Biol. Chem.*, 378, 731-744.

Cypionka, H. & Meyer, O. (1982) Influence of carbon monoxide on growth and respiration of carboxydobacteria and other aerobic organisms. *FEMS Microbiol. Lett.*, 15, 209-214.

Cypionka, H. & Meyer, O. (1983) Carbon monoxide-insensitive respiratory chain of *Pseudomonas carboxydovorans*. *J. Bacteriol.*, 156, 1178-1187.

Darnault, C., Volbeda, A., Kim, E. J., Legrand, P., Vernède, X., Lindahl, P. A. & Fontecilla-Camps, J. C. (2003) Ni-Zn-[Fe₄-S₄] and Ni-Ni-[Fe₄-S₄] clusters in closed and open subunits of acetyl-CoA synthase/carbon monoxide dehydrogenase. *Nat. Struct. Biol.*, 10, 271-279.

De Beus, M. D., Chung, J. & Colón, W. (2004) Modification of cysteine 111 in Cu/Zn superoxide dismutase results in altered spectroscopic and biophysical properties. *Protein Sci.*, 13, 1347-1355.

Derman, A. I., Prinz, W. A., Belin, D. & Beckwith, J. (1993) Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science*, 262, 1744-1747.

DeRose, V. J., Telser, J., Anderson, M. E., Lindahl, P. A. & Hoffman, B. M. (1998) A multinuclear ENDOR study of the C-cluster in CO dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*: evidence for H x O and histidine coordination to the [Fe₄S₄] center. *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 8767-8776.

Dobbek, H. (2011) Structural aspects of mononuclear Mo/W-enzymes. *Coord. Chem. Rev.*, 255, 1104-1116.

Dobbek, H., Gremer, L., Meyer, O. & Huber, R. (1999) Crystal structure and mechanism of CO dehydrogenase, a molybdo iron-sulfur flavoprotein containing S-selanylcysteine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96, 8884-8889.

Dobbek, H., Svetlitchnyi, V., Gremer, L., Huber, R. & Meyer, O. (2001) Crystal structure of a carbon monoxide dehydrogenase reveals a [Ni-4Fe-5S] cluster. *Science*, 293, 1281-1285.

Dobbek, H., Gremer, L., Kiefersauer, R., Huber R. & Meyer, O. (2002) Catalysis et a dinuclear [CuSMo(=O)OH] cluster in a CO dehydrogenase resolved et 1.1-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99, 15971-15976.

Dos Santos, P. C., Dean, D. R., Hu, Y. & Ribbe, M. (2004) Formation and insertion of the nitrogenase iron-molybdenum cofactor. *Chem. Rev.*, 104, 1159-1173.

Doukov, T. I., Iverson, T. M., Seravalli, J., Ragsdale, S. W. & Drennan, C. L. (2002) A Ni-Fe-Cu center in a bifunctional carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase. *Science*, 298, 567-572.

Drennan, C. L., Heo, J., Sintchak, M. D., Schreiter, E. & Ludden, P. W. (2001) Life on carbon monoxide: X-ray structure of *Rhodospirillum rubrum* Ni-Fe-S carbon monoxide dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98, 11973-11978.

Drennan, C. L. & Peters, J. W. (2003) Surprising cofactors in metalloenzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 13, 220-226.

Ducruix, A. & Giege, R. (1992) Crystallization of nucleic acids and proteins. A practical approach. *Oxford University Press*, Oxford, U.K.

Dye, W. B., Bretthauer, E., Seim, H. J. & Blincoe, C. (1987) Fluorometric determination of selenium in plants and animals with 3,3'-Diaminobenzidine. *Analyt. Chem.*, 35, 1687-1693.

Elmlund, H., Lundqvist, J., Al-Karadaghi, S., Hansson, M., Hebert, H. & Lindahl M. (2008) A new cryo-EM single-particle *ab initio* reconstruction method visualizes secondary structure elements in an ATP-fueled AAA+ motor. *J. Mol. Biol.*, 375, 934-947.

Evans, P. A., Dobson, C. M., Kautz, R. A., Hatfull, G. & Fox, R. O. (1987) Proline isomerism in staphylococcal nuclease characterized by NMR and site-directed mutagenesis. *Nature*, 329, 266-268.

Evans, W. J. & Martin, C. J. (1988) Heat of complex formation of Al(III) and Cd(II) with phytic acid. IX. *J. Inorg. Biochem.*, 34, 11-18.

Fay, A. W., Blank, M. A., Yoshizawa, J. M., Lee, C. C., Wiig, J. A., Hu, Y., Hodgson, K. O., Hedman, B. & Ribbe M. W. (2010) Formation of a homocitrate-free iron-molybdenum cluster on NifEN: implications for the role of homocitrate in nitrogenase assembly. *Dalton Trans.*, 39, 3124-3130.

Ferner, M. (2001) Analyse der CoxD-Funktion bei der posttranslationalen Reifung der CuMo-CO-Dehydrogenase. *Dissertation, Universität Bayreuth*.

Ferry, J. G. (1995) CO dehydrogenase. *Annu. Rev. Microbiol.*, 49, 305-333.

Flavin, M. (1962) Microbial transsulfuration: the mechanism of an enzymatic disulfide elimination reaction. *J. Biol. Chem.*, 237, 768-777.

Fodje, M. N., Hansson, A., Hansson, M., Olsen, J. G., Gough, S., Willows, R. D. & Al-Karadaghi, S. (2001) Interplay between an AAA module and an integrin I domain may regulate the function of magnesium chelatase. *J. Mol. Biol.*, 311, 111-122.

Fogo, J. K. & Popowsky, M. (1949) Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide. *Anal. Chem.*, 21, 732-734.

Fontecilla-Camps, J. C. & Ragsdale, S. W. (1999) Nickel-iron-sulfur active sites: hydrogenase and CO dehydrogenase. In: Sykes, A. G. & Cammack, R. (eds.), *Advances in inorganic chemistry*. Academic Press, Inc., San Diego, 47, 283-333.

Freiberg, A. (2001) Mutation und funktionelle Analyse des *coxE*-Gens in *Oligotropha carboxidovorans*. *Diplomarbeit, Universität Bayreuth*.

Fuhrmann, S., Ferner, M., Jeffke, T., Henne, A., Gottschalk, G. & Meyer, O. (2003) Complete nucleotide sequence of the circular megaplasmid pHCG3 of *Oligotropha carboxidovorans*: function in the chemolithoautotrophic utilization of CO, H₂ and CO₂. *Gene*, 322, 67-75.

Futo, S. & Meyer, O. (1986) CO₂ is the first species formed upon CO oxidation by CO dehydrogenase from *Pseudomonas carboxydovorans*. *Arch. Microbiol.*, 145, 358-360.

Gnida, M., Ferner, R., Gremer, L., Meyer, O. & Meyer-Klaucke, W. (2003) A novel binuclear [CuSMo] cluster at the active site of carbon monoxide dehydrogenase: characterization by X-ray absorption spectroscopy. *Biochemistry*, 42, 222-230.

Goodman, D. & Matzura, H. (1971) An improved method of counting radioactive acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 42, 481-486.

Gorbalenya, A. E. & Koonin, E. V. (1993) Helicases: amino acid sequence comparisons and structure - function relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 3, 419-429.

Gremer, L. (2000) Kristallisation und Funktion von Kohlenmonoxid-Dehydrogenase, ein Seleno-Molybo-Eisen-Schwefel-Flavoprotein. *Dissertation, Universität Bayreuth*.

Gremer, L. & Meyer, O. (1996) Purification of carbon monoxide dehydrogenase multienzyme complex (CODH) from autotrophically grown *Oligotropha carboxidovorans*. In: *Chromatographic applications on: Resource, Source, Superdex*. Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden, 28-29.

Gremer, L., Kellner, S., Dobbek, H., Huber, R. & Meyer, O. (2000) Binding of a flavin adenine dinucleotide to molybdenum-containing carbon monoxide dehydrogenase from *Oligotropha carboxidovorans*. Structural and functional analysis of a carbon monoxide dehydrogenase species in which the native flavoprotein has been replaced by its recombinant counterpart produced in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 275, 1864-1872.

Gu, W., Servalli, J., Ragsdale, S. & Cramer, S. (2004) CO-induced structural rearrangement of the C cluster in *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* CO dehydrogenases - evidence from K-edge X-ray absorption spectroscopy. *Biochem.*, 43, 9029-9035.

Hager, A. (2011) Charakterisierung der CO-Dehydrogenase aus der Mutante *Oligotropha carboxidovorans* OM5 G::km. *Bachelorarbeit, Universität Bayreuth*.

Hanson, P. I. & Whiteheart, S. W. (2005) AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6, 519-529.

Hegemann, G. (1980) Oxidation of carbon monoxide by bacteria. *TIBS*, 5, 256-259.

Hewick, R. M., Hunkapiller, M. W., Hood, L. E. & Dreyer, W. J. (1981) A gas-liquid solid phase peptid and protein sequenator. *J. Biol. Chem.*, 256, 7990-7997.

Hille, R. (1996) The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem. Rev.*, 96, 2757-2816.

Hille, R. (2002) Molybdenum and tungsten in biology. *Trends Biochem. Sci.*, 27, 360-367.

Hille, R. (2005) Molybdenum-containing hydroxylases. *Arch. Biochem. Biophys.*, 433, 107-116.

Hille, R. (2013) The molybdenum oxotransferases and related enzymes. *Dalton Trans.*, 42, 3029-3042.

Hille, R., Hall, J. & Basu, P. (2014) The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem. Rev.*, 114, 3963-4038.

Hillmann, G. (1971) Continuous photometric measurement of prostate acid phosphatase activity. *Zeitschrift für Klinische Chemie und Klinische Biochemie*, 9, 273-274.

Hofmann, M., Kassube, J. K. & Graf, T. (2005) The mechanism of Mo-/Cu-dependent CO dehydrogenase. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 10, 490-495.

Holm, R. H., Kennepohl, P. & Solomon, E. I. (1996) Structural and functional aspects of metal sites in biology. *Chem. Rev.*, 96, 2239-2314.

Houk, R. S., Fassel, V. A., Flesch, G. D., Svec, H. J., Gray, A. L. & Taylor, C. E. (1980) Inductively coupled argon plasma as an ion source for mass spectrometric determination of trace elements. *Anal. Chem.*, 52, 2283-2289.

Howard, J. B. & Rees, D. C. (1996) Structural basis of biological nitrogen fixation. *Chem. Rev.*, 96, 2965-2982.

Hu, Y. & Ribbe, M. W. (2013) Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *J. Biol. Chem.*, 288, 13173-13177.

Hu Y., Fay A. W., Schmid B., Makar B. & Ribbe M. W. (2006a) Molecular insights into nitrogenase FeMoco insertion. Trp-444 of MoFe protein α subunit locks FeMoco in its binding site. *J. Biol. Chem.*, 281, 30534-30541.

Hu, Y., Corbett M. C., Fay A. W., Webber, J. A., Hodgson K. O., Hedman, B. & Ribbe M. W. (2006b) FeMo cofactor maturation on NifEN. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103, 17119-17124.

Hu, Y., Corbett M. C., Fay A. W., Webber, J. A., Hodgson K. O., Hedman, B. & Ribbe M. W. (2006c) Nitrogenase Fe protein: a molybdate/homocitrate insertase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103, 17125-17130.

Hu, Z., Ma, B., Wolfson, H. & Nussinov, R. (2000) Conservation of polar residues as hot spots at protein interfaces. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, 39, 331-342.

Huang, X. & Miller, W. (1991) A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Adv. Appl. Math.*, 12, 337-357.

Hunkapiller, M. W., Lujan, E., Ostrander, F. & Hood, L. E. (1983) Isolation of microgram quantities of proteins from polyacrylamide gels for amino acid sequence analysis. *Meth. Enzymol.*, 91, 227-236.

Iost, I., Bizebard, T. & Dreyfus, M. (2013) Functions of DEAD-box proteins in bacteria: Current knowledge and pending questions. *Biochim. Biophys. Acta*, 1829, 866-877.

Isenberg, G. (1995) Ammonium Sulfate Precipitation. In: *Cytoskeleton Proteins: A Purification Manual. Springer Lab Manual*, Springer Verlag Berlin-Heidelberg, 15-16.

Jacobitz, S. & Meyer, O. (1986) Reduced pyridine-nucleotides in *Pseudomonas carboxydovorans* are formed by reverse electron-transfer linked to proton motive force. *Arch. Microbiol.*, 145, 372-377.

Jeon, W. B., Singer, S. W., Ludden, P. W. & Rubio, L. M. (2005) New insights into the mechanism of nickel insertion into carbon monoxide dehydrogenase: analysis of *Rhodospirillum rubrum* carbon monoxide dehydrogenase variants with substituted ligands to the [Fe₃S₄] portion of the active-site C-cluster. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 10, 903-912.

Jeoung, J. H. & Dobbek, H. (2007) Carbon dioxide activation at the Ni,Fe-cluster of anaerobic carbon monoxide dehydrogenase. *Science*, 318, 1461-1464.

Jessee, J. (1986) New subcloning efficiency competent cells: >10⁶ transformants/ µg. *Focus*, 8/4, 9-10.

Jiang, L., He, L. & Fountoulakis, M. (2004) Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *J. Chromatogr. A.*, 1023, 317-320.

Johannes, J. (2003) Rekonstitution und Reaktivität des binuklearen Metallzentrums von CO Dehydrogenase. *Diplomarbeit, Universität Bayreuth*.

Johnson, A. & O'Donnell, M. (2003) Ordered ATP hydrolysis in the γ complex clamp loader AAA+ machine. *J. Biol. Chem.*, 278, 14406-14413.

Johnson, J. L., Hainline, B. E. & Rajagopalan, K. V. (1980) Characterization of the molybdenum cofactor of sulfite oxidase, xanthine oxidase, and nitrate reductase. Identification of a pteridine as a structural component. *J. Biol. Chem.*, 255, 1783-1786.

Johnson, J. L., Rajagopalan, K. V. & Meyer, O. (1990) Isolation and characterization of a second molybdopterin dinucleotide: Molybdopterin cytosine dinucleotide. *Arch. Biochem. Biophys.*, 283, 542-545.

Kaneko, T., Minamisawa, K., Isawa, T., Nakatsukasa, H., Mitsui, H., Kawaharada, Y., Nakamura, Y., Watanabe, A., Kawashima, K., Ono, A., Shimizu, Y., Takahashi, C., Minami, C., Fujishiro, T., Kohara, M., Katoh, M., Nakazaki, N., Nakayama, S. & Sato, S. (2010) Complete genomic structure of the cultivated rice endophyte *Azospirillum* sp. B510. *DNA Res.*, 17, 37-50.

Kaneko, T., Maita, S., Hirakawa, H., Uchiike, N., Minamisawa, K., Watanabe, A. & Sato, S. (2011) Complete genome sequence of the soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum* Strain USDA6T. *Genes (Basel)*, 2, 763-787.

Kang, B. S. & Kim, Y. M. (1999) Cloning and molecular characterization of the genes for carbon monoxide dehydrogenase and localization of molybdopterin, flavin adenine dinucleotide, and iron-sulfur centers in the enzyme of *Hydrogenophaga pseudoflava*. *J. Bacteriol.*, 181, 5581-5590.

Karlin, S., Zhu, Z. Y. & Karlin, K. D. (1997) The extended environment of mononuclear metal centers in protein structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94, 14225-14230.

Kawarabayasi, Y., Hino, Y., Horikawa, H., Yamazaki, S., Haikawa, Y., Jin-no, K., Takahashi, M., Sekine, M., Baba, S., Ankai, A., Kosugi, H., Hosoyama, A., Fukui, S., Nagai, Y., Nishijima, K., Nakazawa, H., Takamiya, M., Masuda, S., Funahashi, T., Tanaka, T., Kudoh, Y., Yamazaki, J., Kushida, N., Oguchi, A., Aoki, K., Kubota, K., Nakamura, Y., Nomura, N., Sako, Y. & Kikuchi, H. (1999) Complete genome sequence of an aerobic hyper-thermophilic crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1. *DNA Res.*, 6, 83-101.

Kay, A. & Mitchell, P. C. H. (1968) Molybdenum-Cysteine Complex. *Nature*, 219, 267-268.

Kessler, D. (2006) Enzymatic activation of sulfur for incorporation into biomolecules in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.*, 30, 825-840.

Kies, A. K., De Jonge, L. H., Kemme, P. A. & Jongbloed, A. W. (2006) Interaction between protein, phytate, and microbial phytase. In vitro studies. *J. Agric Food Chem.*, 54, 1753-1758.

Kim, Y. M. & Hegeman, G. D. (1981a) Electron transport system of an aerobic carbon monoxide-oxidizing bacterium. *J. Bacteriol.*, 148, 991-994.

Kim, Y. M. & Hegeman, G. D. (1981b) Purification and some properties of carbon monoxide dehydrogenase from *Pseudomonas carboxydohydrogena*. *J. Bacteriol.*, 148, 904-911.

Kim, Y. M. & Hegeman, G. D. (1983) Oxidation of carbon monoxide by bacteria. *Int. Rev. Cytol.*, 81, 1-32.

King, G. M. (2003) Molecular and culture-based analyses of aerobic carbon monoxide oxidizer diversity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 7257-7265.

Krafft, T., Bokranz, M., Klimmek, O., Schröder, I., Fahrenholz, F., Kojro, E. & Kröger, A. (1992) Cloning and nucleotide sequence of the *psrA* gene of *Wolinella succinogenes* polysulfide reductase. *Eur. J. Biochem.*, 206, 503-510.

Kniemeyer, O. & Heider, J. (2001) Ethylbenzene dehydrogenase, a novel hydrocarbon-oxidizing molybdenum/iron-sulfur/heme enzyme. *J. Biol. Chem.*, 276, 21381-21386.

Kraut, M. & Meyer, O. (1988) Plasmids in carboxidotrophic bacteria, physical and restriction analysis. *Arch. Microbiol.*, 149, 540-546.

Kraut, M., Hugendieck, I., Herwig, S. & Meyer, O. (1989) Homology and distribution of CO-Dehydrogenase structural genes in carboxydophilic bacteria. *Arch. Microbiol.*, 152, 335-341.

Kreß, O., Gnida, M., Pelzmann, A. M., Marx, C., Meyer-Klaucke, W. & Meyer, O. (2014) Reversible inactivation of CO dehydrogenase with thiol compounds. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 447, 413-418.

Krishnan, N., Fu, C., Pappin, D. J. & Tonks, N. K. (2011) H₂S-induced sulfhydration of the phosphatase PTP1B and its role in the endoplasmic reticulum stress response. *Sci. Signal.*, 4, ra86, DOI: 10.1126/scisignal.2002329.

Krüger, B. & Meyer, O. (1986) The pterin (bactopterin) of carbon monoxide dehydrogenase from *Pseudomonas carboxydoflava*. *Eur. J. Biochem.*, 157, 121-128.

Krüger, B. & Meyer, O. (1987) Structural elements of bactopterin from *Pseudomonas carboxydoflava* carbon monoxide dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta.*, 912, 357-364.

Kung, Y. & Drennan, C. L. (2011) A role for nickel-iron cofactors in biological carbon monoxide and carbon dioxide utilization. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 15, 276-283.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

Lam K.-W. & Yam L. T. (1977) Biochemical characterization of the tartrate-resistant acid phosphatase of human spleen with leukemic reticuloendotheliosis as a pyrophosphatase. *Clin. Chem.*, 23, 89-94.

Lee, J.-O., Rieu, P., Arnout, M. A. & Liddington, R. (1995) Crystal structure of the A domain from the α -subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell*, 80, 631-638.

Leimkühler, S. & Klipp, W. (1999) Role of XDHC in Molybdenum cofactor insertion into xanthine dehydrogenase of *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.*, 181, 2745-2751.

Leipe, D. D., Koonin, E. V. & Aravind, L. (2003) Evolution and classification of P-loop kinases and related proteins. *J. Mol. Biol.*, 333, 781-815.

Lemmon, M. A. (2004) Pleckstrin homology domains: not just for phosphoinositides. *Biochem. Soc. Trans.*, 32, 707-711.

Lemmon, M. A. (2008) Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 9, 99-111.

Leuthäuser, S. (2000) Genetische und biochemische Analyse des *coxF*-Gens und seines Genproduktes in *Oligotropha carboxidovorans*. *Diplomarbeit, Universität Bayreuth*.

- Li, S. G., Tang, Y. Q., Nie, Y., Cai, M. & Wu, X. L. (2011)** Complete genome sequence of *Polymorphum gilvum* SL003B-26A1T, a crude oil-degrading bacterium from oil-polluted saline soil. *J. Bacteriol.*, 193, 2894-2895.
- Lilie, H., Schwarz, E. & Rudolph, R. (1998)** Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr. Opin. Biotech.*, 9, 467-501.
- Lin, X. (2000)** Universal procedure for refolding recombinant proteins. US 2001/0044521 A1.
- Lindahl, P. A. & Chang B., (2001)** The evolution of acetyl-CoA synthase. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 31, 403-434.
- Lindahl, P. A. (2002)** The Ni-containing carbon monoxide dehydrogenase family: light at the end of the tunnel? *Biochemistry*, 41, 2097-2105.
- Linder, P. (2006)** Dead-box proteins: a family affair - active and passive players in RNP-remodeling. *Nucl. Acids Res.*, 34, 4168-4180.
- Linder, P. & Jankowsky, E. (2011)** From unwinding to clamping - the DEAD box RNA helicase family. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 12, 505-516.
- Liu, Y. & Eisenberg, D. (2002)** 3D domain swapping: as domains continue to swap. *Protein Sci.*, 11, 1285-1299.
- Lorite, M. J., Sanjuan, J., Olivares, J. & Bedmar, E. J. (1997)** GenBank, number AJ224684.
- Lucas, S., Copeland, A., Lapidus, A., Cheng, J.-F., Bruce, D., Goodwin, L., Pitluck, S., Land, M. L., Hauser, L., Chang, Y.-J., Jeffries, C., Prakah, O., Elkins, J. G., Brown, S. D., Palumbo, A. V., Hemme, C., Zhou, J., Watson, D. B. & Woyke, T. J. (2010)** The draft genome of *Afipia* sp. 1NLS2. *Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.*

Lundqvist, J., Elmlund, H., Wulff, R. P., Berglund, L., Elmlund, D., Emanuelsson, C., Hebert, H., Willows, R. D., Hansson, M., Lindahl, M. & Al-Karadaghi, S. (2010) ATP-induced conformational dynamics in the AAA+ motor unit of magnesium chelatase. *Structure*, 18, 354-365.

Maisel, T. (2012) Die AAA+ ATPase CoxD aus *Oligotropha carboxidovorans* OM5. *Dissertation, Universität Bayreuth*.

Maisel, T., Joseph, S., Mielke, T., Bürger, J., Schwarzing, S. & Meyer, O. (2012) The CoxD Protein, a novel AAA+ ATPase involved in metal cluster assembly: hydrolysis of nucleotide-triphosphates and oligomerization. *PLoS One* 7, e47424, DOI: 10.1371/journal.pone.0047424.

Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J. B., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., Fong, J. H., Geer, L. Y., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Jackson, J. D., Ke, Z., Lanczycki, C. J., Lu, F., Marchler, G. H., Mullokandov, M., Omelchenko, M. V., Robertson, C. L., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Zhang, D., Zhang, N., Zheng, C. & Bryant, S. H. (2011) CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res.*, 39, 225-229.

Martin, R. G. & Ames, B. N. (1961) A method for determining the sedimentation behaviour of enzymes: Application to protein mixtures. *J. Biol. Chem.*, 236, 1372-1379.

Matsudaira, P. (1987) Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto Polyvinylidene Difluoride membranes. *J. Biol. Chem.*, 262, 10035-10038.

Maynard, E. L. & Lindahl, P. A. (1999) Evidence of a molecular tunnel connecting the active sites for CO₂ reduction and acetyl-CoA synthesis in acetyl-CoA synthase from *Clostridium thermoaceticum*. *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 9221-9222.

Mendel, R. & Schwarz, G. (1999) Molybdoenzymes and molybdenum cofactor in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 18, 33-69.

Mendel, R. R. & Bittner, F. (2006) Cell biology of molybdenum. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1763, 621-635.

Mendel, R. R., Smith, A. G., Marquet, A. & Warren, M. J. (2007) Metal and cofactor insertion. *Nat. Prod. Rep.*, 24, 963-971.

Menon, S. & Ragsdale, S. W. (1999) The role of an iron-sulfur cluster in an enzymatic methylation reaction. Methylation of CO dehydrogenase / acetyl-CoA synthase by the methylated corrinoid iron-sulfur protein. *J. Biol. Chem.*, 274, 11513-11518.

Meyer, O. (1978) Kohlenmonoxidoxidation und -assimilation durch das aerobe Wasserstoffbakterium *Pseudomonas carboxydovorans*. *Dissertation, Universität Göttingen*.

Meyer, O. (1982) Chemical and spectral properties of carbon monoxide: methylene blue oxidoreductase. The molybdenum-containing iron-sulfur flavoprotein from *Pseudomonas carboxydovorans*. *J. Biol. Chem.*, 257, 1333-1341.

Meyer, O. (2005) Genus VII. *Oligotropha*. In: G. M. Garrity (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. Springer, New York, 468-471.

Meyer, O. & Rajagopalan, K. V. (1984) Molybdopterin in carbon monoxide oxidase from carboxydotrophic bacteria. *J. Bacteriol.*, 157, 643-648.

Meyer, O. & Rohde, M. (1984) Enzymology and bioenergetics of carbon monoxide-oxidizing bacteria. In: Crawford, R. L. und Hanson, R. S. (eds.), *Microbial growth on C₁-compounds*. American Society of Microbiology, Washington DC, USA, 26-33.

Meyer, O. & Schlegel H. G. (1978) Reisolation of the carbon monoxide utilizing hydrogen bacterium *Pseudomonas carboxydovorans* (Kistner) comb. nov. *Arch. Microbiol.*, 118, 35-43.

Meyer, O. & Schlegel, H. G. (1980) Carbon monoxide:methylene blue oxidoreductase from *Pseudomonas carboxydovorans*. *J. Bacteriol.*, 141, 74-80.

Meyer, O. & Schlegel, H. G. (1983) Biology of aerobic carbon-monoxide-oxidizing bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 37, 277-310.

Meyer, O., Frunzke, K., Gadkari, D., Jacobitz, S., Hugendieck, I. & Kraut, M. (1990) Utilization of carbon monoxide by aerobes - recent advances. *FEMS Microbiol. Rev.*, 87, 253-260.

Meyer, O., Frunzke, K. & Mörsdorf, G. (1993a) Biochemistry of the aerobic utilization of carbon monoxide. In: Murell, J. C., Kelly, D. P. (eds.), *Microbial growth on C₁-compounds*. Intercept Ltd., Andover, 433-459.

Meyer, O., Stackebrandt, E. & Auling, G. (1993b) Reclassification of ubiquinone Q-10 containing carboxidotrophic bacteria: transfer of "[*Pseudomonas*] *carboxidovorans*" OM5^T to *Oligotropha* gen. nov., as *Oligotropha carboxidovorans*, comb. nov., transfer of "[*Alcaligenes*] *carboxydus*" DSM 1086^T to *Carbophilus*, gen. nov., as *Carbophilus carboxydus*, comb. nov., transfer of "[*Pseudomonas*] *compransoris*" DSM 1231^T to *Zavarzinia*, gen. nov., as *Zavarzinia compransoris*, comb. nov., and amended descriptions of the new genera. *System. Appl. Microbiol.*, 16, 390-395.

Meyer, O., Gremer, L., Ferner, R., Ferner, M., Dobbek, H., Gnida, M., Meyer-Klaucke, W. & Huber, R. (2000) The role of Se, Mo and Fe in the structure and function of carbon monoxide dehydrogenase. *Biol. Chem.*, 381, 865-876.

Mitchell, D. B., Vogel, K., Weimann, B. J., Pasamontes, L. & van Loon, A. P. (1997) The phytase subfamily of histidine acid phosphatases: Isolation of genes for two novel phytases from the fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*. *Microbiology*, 143, 245-252.

Moersdorf, G., Frunzke, K., Gadkari, D. & Meyer, O. (1992) Microbial growth on carbon monoxide. *Biodegradation*, 3, 61-82.

Morpurgo, L., Rotilio, G., Hartmann, H. J. & Weser, U. (1984) Copper (I) transfer into apo-stellacyanin using copper (I) thiourea as a copper-thionein model. *Biochem. J.*, 221, 923-925.

Neumann, M. & Leimkühler, S. (2011) The role of system-specific molecular chaperones in the maturation of molybdoenzymes in bacteria. *Biochem. Res. Int.*, DOI: 10.1155/2011/850924.

Neumann, M., Schulte, M., Jünemann, N., Stöcklein, W. & Leimkühler S. (2006) *Rhodobacter capsulatus* XdhC is involved in molybdenum cofactor binding and insertion into xanthine dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 281, 15701-15708.

Neumann, M., Stöcklein, W., Walburger, A., Magalon, A. & Leimkühler, S. (2007a) Identification of a *Rhodobacter capsulatus* L-cysteine desulfurase that sulfurates the molybdenum cofactor when bound to XdhC and before its insertion into xanthine dehydrogenase. *Biochemistry*, 46, 9586-9595.

Neumann, M., Stöcklein, W. & Leimkühler, S. (2007b) Transfer of the molybdenum cofactor synthesized by *Rhodobacter capsulatus* MoeA to XdhC and MobA. *J. Biol. Chem.*, 282, 28493-28500.

Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L. & Koonin, E. V. (1999) AAA+: a class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.*, 9, 27-43.

Nicolet, Y., Piras, C., Legrand, P., Hatchikian, C. E. & Fontecilla-Camps, J. C. (1999) *Desulfovibrio desulfuricans* iron hydrogenase: the structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center. *Structure*, 7, 13-23.

Nooren, I. M. A. & Thornton, J. M. (2003a) Structural characterisation and functional significance of transient protein-protein interactions. *J. Mol. Biol.*, 325, 991-1018.

Nooren, I. M. A. & Thornton, J. M. (2003b) Diversity of protein-protein interactions. *EMBO J.*, 22, 3486-3492.

Ogura, T. & Wilkinson, A. J. (2001) AAA+ superfamily ATPases: common structure - diverse function. *Genes Cells*, 6, 575-597.

Oh, B. C., Choi, W. C., Park, S., Kim, Y.O. & Oh, T. K. (2004) Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63, 362-372.

Ollagnier-de-Choudens, S., Lascoux, D., Loiseau, L., Barras, F., Forest, E. & Fontecave, M. (2003) Mechanistic studies of the SufS-SufE cysteine desulfurase: evidence for sulfur transfer from SufS to SufE. *FEBS Lett.*, 555, 263-267.

Ostanin, K., Harms, E. H., Stevis, P. E., Kuciel, R., Zhou, M. M. & van Etten, R. L. (1992) Overexpression, site-directed mutagenesis, and mechanism of *Escherichia coli* acid phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 267, 22830-22836.

Pagni, M., Ioannidis, V., Cerutti, L., Zahn-Zabal, M., Jongeneel, C. V., Hau, J., Martin, O., Kuznetsov, D. & Falquet, L. (2007) MyHits: improvements to an interactive resource for analyzing protein sequences. *Nucleic Acids Res.*, 35 (Web Server issue):W433-7.

Palmer, G. (1985) The electron paramagnetic resonance of metalloproteins. *Biochem. Soc. Trans.*, 13, 548-560.

Pan, J. & Carroll, K. S. (2013) Persulfide reactivity in the detection of protein S-sulfhydrylation. *ACS Chem. Biol.*, 8, 1110-1116.

Patel, S. S. & Picha, K. M. (2000) Structure and function of hexameric helicases. *Annu. Rev. Biochem.*, 69, 651-697.

Pau, R. N. & Lawson D. M. (2002) Molybdenum and tungsten: their roles in biological processes. *Met. Ions Biol. Syst.*, 39, 3-74.

Pau, R. N., Klipp, W. & Leimkühler, S. (1997) Molybdenum transport, processing and gene regulation. In: *Iron and related transition metals in microbial metabolism* (Winkelmann, G. & Carrano, C. J., eds.), 217-234, Harwood Academic Publisher, Amsterdam.

Paul, D., Bridges, S., Burgess, S. C., Dandass, Y. & Lawrence, M. L. (2008) Genome sequence of the chemolithoautotrophic bacterium *Oligotropha carboxidovorans* OM5T. *J. Bacteriol.*, 190, 5531-5532.

Paul, D., Bridges, S. M., Burgess, S. C., Dandass, Y. S. & Lawrence, M. L. (2010) Complete genome and comparative analysis of the chemolithoautotrophic bacterium *Oligotropha carboxidovorans* OM5. *BMC Genomics*, 11, 511.

Pause, A. & Sonenberg, N. (1992) Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A. *EMBO J.*, 11, 2643-2654.

Peariso, K., Chohan, B. S., Carrano, C. J. & Kirk, M. L. (2003) Synthesis and EPR characterization of new models for the one-electron reduced molybdenum site of sulfite oxidase. *Inorg. Chem.*, 42, 6194-6203.

Pearson, D. M., O'Reilly, C., Colby, J. & Black, G. W. (1994) DNA sequence of the cutA, B and C genes, encoding the molybdenum containing hydroxylase carbon monoxide dehydrogenase, from *Pseudomonas thermocarboxydovorans* strain C2. *Biochem. Biophys. Acta*, 1188, 432-438.

Pelzmann, A. (2008) Charakterisierung der *coxD*-Funktion bei der posttranslationalen Reifung des [CuSMoO₂]-Zentrums der CO-Dehydrogenase aus *Oligotropha carboxidovorans* OM5. *Dissertation, Universität Bayreuth*.

Pelzmann, A., Ferner, M., Gnida, M., Meyer-Klaucke, W., Maisel, T. & Meyer, O. (2009) The CoxD Protein of *Oligotropha carboxidovorans* is a predicted AAA+ ATPase chaperone involved in the biogenesis of the CO dehydrogenase [CuSMoO₂] cluster. *J. Biol. Chem.*, 284, 9578-9586.

Pelzmann, A., Mickoleit, F. & Meyer, O. (2014) Insights into the posttranslational assembly of the Mo-, S- and Cu-containing cluster in the active site of CO dehydrogenase of *Oligotropha carboxidovorans*. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 19, 1399-1414.

Peters, J. W., Lanzilotta, W. N., Lemon, B. J. & Seefeldt, L. C. (1998) X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (CpI) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution. *Science*, 282, 1853-1858.

Philipp, W. J., Poulet, S., Eiglmeier, K., Pascopella, L., Balasubramanian, V., Heym, B., Bergh, S., Bloom, B. R., Jacobs, W. R. & Cole, S. T. (1996) An integrated map of the genome of the tubercle bacillus, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and comparison with *Mycobacterium leprae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, 3132-3137.

Pilato, R. S. & Stiefel, E. I. (1999) Molybdenum and tungsten enzymes. In: *Bioinorganic Catalysis* (2nd edn) Reedijk, J. and Buowman, E., 81-152, Dekker, NY, USA.

Ponting, C. P. & Aravind, L. (1999) START: a lipid-binding domain in StAR, HD-ZIP and signalling proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 24, 130-132.

Primrose, S. B. & Twyman, R. M. (2006) Principles of gene manipulation and genomics, 7th edition, *Blackwell Publishing*, Malden, MA, USA, S. 86.

Prouty, W. F. & Goldberg, A. L. (1972) Fate of abnormal proteins in *E. coli*. Accumulation in intracellular granules before catabolism. In: *Nature New Biol.*, 240, 147-150.

Prouty, W. F., Karnovsky, M. J. & Goldberg, A. L. (1975) Degradation of abnormal proteins in *E. coli*. *J. Biol. Chem.*, 250, 1112-1122.

Ragsdale, S. W. & Kumar, M. (1996) Nickel-containing carbon monoxide dehydrogenase / acetyl-CoA synthase. *Chem. Rev.*, 96, 2515-2540.

Rajagopalan, K. V. (1996) Biosynthesis of the molybdenum cofactor. In: Neidhardt, F. C., Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M., Umberger, H. E. (eds.), *Escherichia coli and Salmonella cellular and molecular biology*. ASM Press, Washington D. C., 674-679.

Rajagopalan, K. V. (1997) Biosynthesis and processing of the molybdenum cofactors. *Biochem. Soc. Trans.*, 25, 757-761.

Rajagopalan, K. V. & Handler P. J. (1964) The absorption spectra of iron-flavoproteins. *J. Biol. Chem.*, 239, 1509-1514.

Ray, W. K., Zeng, G., Potters, M. B., Mansuri, A. M. & Larson, T. J. (2000) Characterization of a 12-kilodalton rhodanese encoded by *glpE* of *Escherichia coli* and its interaction with thioredoxin. *J. Bacteriol.*, 182, 2277-2284.

Resch, M. (2004) Chemische Rekonstitution des aktiven Zentrums der Kohlenmonoxid-Dehydrogenase aus *Oligotropha carboxidovorans*. *Diplomarbeit, Universität Bayreuth*.

Resch, M., Dobbek H. & Meyer, O. (2005) Structural and functional reconstruction in situ of the [CuSMoO₂] active site of carbon monoxide dehydrogenase from the carbon monoxide oxidizing eubacterium *Oligotropha carboxidovorans*. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 10, 518-528.

Rinsland, C. P., Goldman, A., Hannigan, J. W., Wood, S. W., Chiou, L. S. & Mahieu, E. (2007) Long-term trends of tropospheric carbon monoxide and hydrogen cyanide from analysis of high resolution infrared solar spectra. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.*, 104, 40-51.

Robinson, E. & Robbins, R. C. (1970) Atmospheric background concentrations of carbon monoxide. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 174, 89-95.

Rocak, S. & Linder, P. (2004) DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5, 232-241.

Rocak, S., Emery, B., Tanner, N. K. & Linder, P. (2005) Characterization of the ATPase and unwinding activities of the yeast DEAD-box protein Has1p and the analysis of the roles of the conserved motifs. *Nucleic Acids Res.*, 33, 999-1009.

Rochet, J.-C., Brownie, E. R., Oikawa, K., Hicks, L. D., Fraser, M. E., James, M. N. G., Kay, C. M., Bridger, W. A. & Wolodko, W. T. (2000) Pig heart CoA transferase exists as two oligomeric forms separated by a large kinetic barrier. *Biochemistry*, 39, 11291-11302.

Rodriguez, H., Kohr, W. J. & Harkins, R. N. (1984) Design and operation of a completely automated Beckman microsequencer. *Anal. Biochem.*, 140, 538-547.

Rogers Jr., G. W., Komar, A. A. & Merrick, W. C. (2002) eIF4A: the godfather of the DEAD box helicases. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 72, 307-331.

Roth, J. R., Benson, N., Galitski, T., Haack, K. & Lawrence, J. G. (1996) Rearrangements of the bacterial chromosome: formation and applications. In: Neidhardt, F. C., Curtiss III, R., Ingraham, J. I., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M., Umberger, H. E. (eds.), *Escherichia coli and Salmonella cellular and molecular biology*. ASM Press, Washington DC, 2256-2276.

Rubino, J. T., Chenkin, M. P., Keller, M., Riggs-Gelasco, P. & Franz, K. J. (2010) A comparison of methionine, histidine and cysteine in copper(I)-binding peptides reveals differences relevant to copper uptake by organisms in diverse environments. *Metallomics*, 3, 61-73.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.

Santiago, B. & Meyer, O. (1996) Characterization of hydrogenase activities associated with the molybdenum CO dehydrogenase from *Oligotropha carboxidovorans*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 136, 157-162.

Santiago, B. & Meyer, O. (1997) Purification and molecular characterization of the H₂ uptake membrane-bound NiFe-hydrogenase from the carboxidotrophic bacterium *Oligotropha carboxidovorans*. *J. Bacteriol.*, 179, 6053-6060.

Santiago, B., Schübel, U., Egelseer, C. & Meyer, O. (1999) Sequence analysis, characterization and CO-specific transcription of the *cox* gene cluster on the megaplasmid pHCG3 of *Oligotropha carboxidovorans*. *Gene*, 236, 115-124.

Santos-Silva, T., Ferroni F., Thapper A., Marangon J., Gonzalez P. J., Rizzi A. C., Moura I., Moura J. J., Romao M. J. & Brondino C. D. (2009) Kinetic, structural, and EPR studies reveal that aldehyde oxidoreductase from *Desulfovibrio gigas* does not need a sulfido ligand for catalysis and give evidence for a direct Mo-C interaction in a biological system. *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 7990-7998.

Savitzky, A. & Golay, M. J. E. (1964) Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Anal. Chem.*, 36, 1627-1639.

Schachman, H. K. (1959) Ultracentrifugation in biochemistry. Academic Press, Inc. New York.

Schein, C. H. & Noteborn, M. H. M. (1988) Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Nat. Biotech.*, 6, 291-294.

Schneider, G., Lindqvist, Y. & Vihko, P. (1993) Three-dimensional structure of rat acid phosphatase. *EMBO J.*, 12, 2609-2615.

Schock, M. (2012) *Forschungsmodul Lehrstuhl Mikrobiologie, Universität Bayreuth.*

Schock, M. (2013) Rekonstitution von CO-Dehydrogenase mit Selenverbindungen: Struktur- und Funktionsanalysen am aktiven Zentrum. *Masterarbeit, Universität Bayreuth.*

Schübel, U., Kraut, M., Mörsdorf, G. & Meyer, O. (1995) Molecular characterization of the gene cluster *coxMSL* encoding the molybdenum-containing carbon monoxide dehydrogenase of *Oligotropha carboxidovorans*. *J. Bacteriol.*, 177, 2197-2203.

Schübel, U. (1996) CO-Dehydrogenase aus *Oligotropha carboxidovorans*: Molekularbiologische Analyse des CO-Stimulons und Charakterisierung von rekombinantem CoxS. *Dissertation, Universität Bayreuth.*

Schwarz G., Mendel R. R. & Ribbe M. W. (2009) Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature*, 460, 839-847.

Segueilha, L., Lambrechts, C., Boze, H., Moulin, G. & Galzy, P. (1992) Purification and properties of the phytase from *Schwanniomyces castellii*. *J. Ferment. Bioeng.*, 74, 7-11.

Seravalli, J. & Ragsdale, S. W. (2000) Channeling of carbon monoxide during anaerobic carbon dioxide fixation. *Biochemistry*, 39, 1274-1277.

Shanmugam, M., Wilcoxon, J., Habel-Rodriguez, D., Cutsail, G. E. III, Kirk, M. L., Hoffman, B. M. & Hille, R. (2013) ^{13}C and $^{63,65}\text{Cu}$ ENDOR studies of CO dehydrogenase from *Oligotropha carboxidovorans*. Experimental evidence in support of a copper-carbonyl intermediate. *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 17775-17782.

Siegbahn, P. E. & Shestakov, A. F. (2005) Quantum chemical modeling of CO oxidation by the active site of molybdenum CO dehydrogenase. *J. Comput. Chem.*, 26, 888-898.

Sigrist, C. J. A., Cerutti, L., Hulo, N., Gattiker, A., Falquet, L., Pagni, M., Bairoch, A. & Bucher, P. (2002) PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Brief Bioinform.*, 3, 265-274.

Sigrist, C. J. A., de Castro, E., Cerutti, L., Cuče, B. A., Hulo, N., Bridge, A., Bougueleret, L. & Xenarios, I. (2013) New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Res.*, 41 (Database issue), 344-347.

Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology*, 1, 7784-7790.

Singh, S. M. & Panda, A. K. (2005) Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J. Biosci. Bioeng.*, 99, 303-310.

Sirijovski, N., Lundqvist, J., Rosenbäck, M., Elmlund, H., Al-Karadaghi, S., Willows R. D. & Hansson, M. (2008) Substrate-binding model of the chlorophyll biosynthetic magnesium chelatase BchH subunit. *J. Biol. Chem.*, 283, 11652-11660.

- Smith, G. R., Contreras-Moreira, B., Zhang, X. & Bates, P. A. (2004)** A link between sequence conservation and domain motion within the AAA+ family. *J. Struct. Biol.*, 146, 189-204.
- Smith, A. D., Jameson, G. N. L., Dos Santos, P. C., Agar, J. N., Naik, S., Krebs, C., Frazzon, J., Dean, D. R., Huynh, B. H. & Johnson, M. K. (2005)** NifS-mediated assembly of [4Fe-4S] clusters in the N- and C-terminal domains of the NifU scaffold protein. *Biochemistry*, 44, 12955-12969.
- Snider, J., Thibault G. & Houry, W. A. (2008)** The AAA+ superfamily of functionally diverse proteins. *Genome Biol.*, 9, 216.
- Stark, G. R., Stein, W. H. & Moore, S. (1960)** Reactions of the cyanate present in aqueous urea with amino acids and proteins. *J. Biol. Chem.*, 235, 3177-3181.
- Staron, P. (2008)** Analyse der *coxE*-Funktion bei der posttranslationalen Reifung des [CuSMoO₂] aktiven Zentrums von CO-Dehydrogenase. *Diplomarbeit, Universität Bayreuth*.
- Strand, B. C. & Sypherd, P. S. (1969)** Unique protein moieties for 30S and 50S ribosomes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 98, 1080-1086.
- Svetlitchnyi, V., Peschel, C., Acker, G. & Meyer, O. (2001)** Two membrane-associated NiFeS - carbon monoxide dehydrogenases from the anaerobic carbon monoxide utilizing eubacterium *Carboxydothemus hydrogenoformans*. *J. Bacteriol.*, 183, 5134-5144.
- Svetlitchnyi, V., Dobbek, H., Meyer-Klaucke, W., Meins, T., Thiele, B., Römer, P., Huber, R. & Meyer, O. (2004)** A functional Ni-Ni-[4Fe-4S] cluster in the monomeric acetyl-CoA synthase from *Carboxydothemus hydrogenoformans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101, 446-451.
- Tanner, N. K. & Linder, P. (2001)** DExD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions. *Mol. Cell*, 8, 251-262.

Tanner, N. K., Cordin, O., Banroques, J., Doère, M. & Linder, P. (2003) The Q motif: a newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. *Mol. Cell*, 11, 127-138.

Tishler, P. V. & Epstein, C. J. (1968) A convenient method of preparing polyacrylamide gels for liquid scintillation spectrometry. *Anal. Biochem.*, 22, 89-98.

Tomblin, G., Schwingel, J. M., Lapek, J. D. Jr, Friedman, A. E., Darrah, T., Maguire, M., van Alst, N. E., Filiatrault, M. J. & Iglewski, B. H. (2013) *Pseudomonas aeruginosa* PA1006 is a persulfide-modified protein that is critical for molybdenum homeostasis. *PLoS One* 8, e55593, DOI: 10.1371/journal.pone.0055593.

Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76, 4350-4354.

Townsend, C. L. & Maynard, R. L. (2002) Effects on health of prolonged exposure to low concentrations of carbon monoxide. *Occup. Environ. Med.*, 59, 708-711.

Tsujishita, Y. & Hurley, J. H. (2000) Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain. *Nat. Struct. Biol.*, 7, 408-414.

Vale, R. D. (2000) AAA Proteins: Lord of the Ring. *J. Cell. Biol.*, 150, F13-F19.

Vallejo, L. F. & Rinas, U. (2004) Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microb. Cell. Fact.*, 3, 2-12.

Van Etten, R. L. (1982) Human prostatic acid phosphatase: a histidine phosphatase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 390, 27-51.

Van Etten, R. L., Davidson R., Stevis P. E., MacArthur H. & Moore D. L. (1991) Covalent structure, disulfide bonding, and identification of reactive surface and active site residues of human prostatic acid phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 266, 2313-2319.

Veeramani, S., Lee, M. S. & Lin, M. F. (2009) Revisiting histidine-dependent acid phosphatases: a distinct group of tyrosine phosphatases. *Trends Biochem. Sci.*, 34, 273-278.

Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., Skupski, M. et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science*, 291, 1304-1351.

Vohra, A. & Satyanarayana, T. (2003) Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 23, 29-60.

Volbeda, A. & Fontecilla-Camps, J. C. (2005) Structural bases for the catalytic mechanism of Ni-containing carbon monoxide dehydrogenases. *Dalton Trans.*, 3443-3450.

Volland, S., Rachinger, M., Strittmatter, A., Daniel, R., Gottschalk, G. & Meyer, O. (2011) Complete genome sequences of the chemolithoautotrophic *Oligotropha carboxidovorans* strains OM4 and OM5. *J. Bacteriol.*, 193, 5043.

Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. & Gay, N. J. (1982) Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.*, 1, 945-951.

Wastl, J. (1996) Heterologe Expression von *coxL*, dem Strukturgen des Molybdoproteins des Kohlenmonoxid-Dehydrogenase-Multienzymkomplexes aus *Oligotropha carboxidovorans*. *Diplomarbeit, Universität Bayreuth*.

Waud, W. R., Brady, F. O., Wiley, R. D. & Rajagopalan, K. V. (1975) A new purification procedure for bovine milk xanthine oxidase: Effect of proteolysis on the subunit structure. *Arch. Biochem. Biophys.*, 169, 695-701.

Webb, M. E., Marquet, A., Mendel, R. R., Rébeillé, F. & Smith, A. G. (2007) Elucidating biosynthetic pathways for vitamins and cofactors. *Nat. Prod. Rep.*, 24, 988-1008.

Wengert, M. (1997) Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von rekombinantem Orf4-Protein. *Diplomarbeit, Universität Bayreuth*.

Westley, J. (1981) Thiosulfate: cyanide sulfurtransferase (rhodanese). *Meth. Enzymol.*, 77, 285-291.

Whitmore, L. & Wallace, B. A. (2004) DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res.*, 32, 668-673.

Whitmore, L. & Wallace, B. A. (2008) Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers*, 89, 392-400.

Whittaker, C. A. & Hynes, R. O. (2002) Distribution and evolution of von Willebrand/Integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol. Biol. of the Cell*, 13, 3369-3387.

Wiig, J. A., Hu, Y. & Ribbe, M. W. (2011) NifEN-B complex of *Azotobacter vinelandii* is fully functional in nitrogenase FeMo cofactor assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 108, 8623-8627.

Wiig, J. A., Hu, Y., Lee, C. C. & Ribbe M. W. (2012) Radical SAM-dependent carbon insertion into nitrogenase M-cluster. *Science*, 337, 1672-1675.

Wilcoxon, J., Snider, S. & Hille, R. (2011a) Substitution of silver for copper in the binuclear Mo/Cu center of carbon monoxide dehydrogenase from *Oligotropha carboxidovorans*. *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 12934-12936.

Wilcoxon, J., Zhang, B. & Hille, R. (2011b) Reaction of the molybdenum- and copper-containing carbon monoxide dehydrogenase from *Oligotropha carboxydovorans* with quinones. *Biochemistry*, 50, 1910-1916.

Wilkinson, D. L. & Harrison, R. G. (1991) Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology*, 9, 443-448.

Willows, R. D. (2003) Biosynthesis of chlorophylls from protoporphyrin IX. *Nat. Prod. Rep.*, 20, 327-341.

Willows, R. D. & Hansson, M. (2003) Mechanism, structure, and regulation of magnesium chelatase. In: *The Tetrapyrrole Handbook II* (Kadish, K. M., Smith, K. M. & Guildard, R. eds), 1-48, *Academic Press*, San Diego, CA.

Wood, J. L. (1987) Sulfane sulfur. *Meth. Enzymol.*, 143, 25-29.

Wyss, M., Brugger, R., Kronenberger, A., Rémy, R., Fimbel, R., Oesterheld, G., Lehmann, M. & van Loon, A. P. (1999) Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 367-373.

Yamada, S., Minoda, Y. & Yamamoto, S. (1972) Chemical and physicochemical properties of phytase from *Aspergillus terreus*. *Agric. Biol. Chem.*, 36, 2097-2103.

Yao, L., Kawakami, Y. & Kawakami, T. (1994) The pleckstrin homology domain of Bruton tyrosine kinase interacts with protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91, 9175-9179.

Yao, M. Z., Zhang, Y. H., Lu, W. L., Hu, M. Q., Wang, W. & Liang, A. H. (2012) Phytases: crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications. *J. Appl. Microbiol.*, 112, 1-14.

Yoshizawa, J. M., Blank, M. A., Fay, A. W., Lee, C. C., Wiig, J. A., Hu, Y., Hodgson, K. O., Hedman, B. & Ribbe, M. W. (2009) Optimization of FeMoco maturation on NifEN. *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 9321-9325.

Zhang, Y. & Gladyshev, V. N. (2008) Molybdoproteomes and evolution of molybdenum utilization. *J. Mol. Biol.*, 379, 881-899.

Zheng, L., White, R. H., Cash, V. L., Jack, R. F. & Dean, D. R. (1993) Cysteine desulfurase activity indicates a role for NifS in metallocluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90, 2754-2758.

Zheng, L., White, R. H., Cash, V. L. & Dean, D. R. (1994) Mechanism for the desulfuration of L-cysteine catalyzed by the *nifS* gene product. *Biochemistry*, 33, 4714-4720.

Zsebo, K. M. & Hearst, J. E. (1984) Genetic-physical mapping of a photosynthetic gene cluster from *R. capsulata*. *Cell*, 37, 937-947.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. O. Meyer für die Aufnahme am Lehrstuhl für Mikrobiologie und die Überlassung eines solch interessanten Themas. Sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit, seine fortwährende Bereitschaft zur Diskussion und die vielen wissenschaftlichen Anregungen, waren eine sehr große Unterstützung.

Ich möchte mich außerdem bei meinen Kollegen Dr. Astrid Pelzmann, Stephanie Joseph, Dr. Oliver Kreß, Katharina Schmidt und Stephanie Geißler für die Motivation, die Ratschläge und die vielen wissenschaftlichen Diskussionen bedanken.

Insbesondere möchte ich auch Dr. Astrid Pelzmann für die Unterstützung bei den ESR-Messungen danken.

Bedanken möchte ich mich bei Matthias Schlotter, Manuel Robertz, Canan Tekin, Brigitte Melzer, Ulrike Brandauer und Lydia Stauber für die praktische Unterstützung und die angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre am Lehrstuhl für Mikrobiologie.

Ferner gilt mein Dank auch Dr. Thorsten Mielke und Jörg Bürger (Max-Planck Institut für molekulare Genetik in Berlin) für die Erstellung transmissionselektronenmikroskopischer Aufnahmen, Prof. Dr. Hermann Schindelin und Dr. Jochen Kuper (Rudolf-Virchow-Zentrum für Experimentelle Biomedizin, Universität Würzburg) für die Transformation von Proteinkristallen, sowie Dr. Stephan Schwarzingen (Lehrstuhl Biopolymere, Universität Bayreuth) für die Aufnahme von CD-Spektren.

Auch an meine Eltern möchte ich an dieser Stelle ein herzliches Dankeschön richten. In allen Höhen und Tiefen meiner Ausbildung habt ihr mich unterstützt und fortlaufend motiviert. Für die zahlreichen Entbehrungen in dieser Zeit danke ich euch.

Eidesstattliche Versicherungen und Erklärungen

(§5 Nr.4 PromO)

Hiermit erkläre ich, dass keine Tatsachen vorliegen, die mich nach der gesetzlichen Bestimmung über die Führung akademischer Grade zur Führung des Doktorgrades unwürdig erscheinen lassen.

(§8 S.2 Nr.5 PromO)

Hiermit erkläre ich mich damit einverstanden, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung hinsichtlich der eigenständigen Anfertigung der Dissertation unterzogen werden kann.

(§8 S.2 Nr.7 PromO)

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades anderweitig eingereicht und habe auch nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden.

(§8 S.2 Nr.9 PromO)

Hiermit erkläre ich, dass ich keine Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern in Anspruch genommen habe und auch künftig nicht nehmen werde.

Ort, Datum, Unterschrift